

„Generierung B-Zell-Rezeptor retrogener Mäuse“



Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl.-Biol. Jenny F. Freitag

geboren am 14. Juli 1981 in Lauchhammer

Jena 2014

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG:

24. September 2014

GUTACHTER:

Prof. Dr. med. Thomas Kamradt

Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Jena

Prof. Dr. rer. nat. Berit Jungnickel

Professur für Zellbiologie, Zentrum für Molekulare Biomedizin (CMB),
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Prof. Dr. rer. nat. Hans-Martin Jäck

Abteilung für Molekulare Immunologie an der Medizinischen Klinik III,
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

„Dans la vie, rien n'est à craindre,
tout est à comprendre.“

Marie Curie

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe und Dritte im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir erhalten haben.

Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt und die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung wurde von mir nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 31. März 2014

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	XI
Summary	XIII
Danksagung	XIV
1. Einleitung	1
1.1. Funktionen der B-Lymphozyten	1
1.2. B-Zell Entwicklung	2
1.2.1. Die Stadien der (murinen) B-Zellentwicklung	3
1.2.2. Störungen in der B-Zell-Entwicklung	6
1.2.3. Der Lysozym-spezifische MD4-B-Zell Rezeptor als Modell	6
1.3. Transgene Mäuse als Werkzeug in der Forschung	9
1.4. Die Verwendung retroviraler Vektoren für den (therapeutischen) Gen-transfer	10
1.5. Retrogene Mäuse	11
1.5.1. Vor- und Nachteile von retrogenen gegenüber transgenen Mäusen	14
1.5.2. TZR retrogene Mäuse	14
1.6. 2A-Peptide	15
1.6.1. Die gebräuchlichsten 2A-Peptide	16
1.6.2. Die Verwendung von 2A-Peptiden	17
1.7. Retrovirale Verpackungssysteme	18
1.8. Das Modell der G6PI-induzierten Arthritis	18
1.9. Zielstellung	20
2. Materialien und Methoden	22
2.1. Biologisches Material	22
2.1.1. Mäuse	22
2.1.2. Bakterienstämme	22
2.1.3. Zelllinien	22
2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	23
2.2.1. Chemikalien	23

2.2.2.	Enzyme	24
2.2.3.	Kits	24
2.2.4.	Verbrauchsmaterialien	24
2.3.	Geräte	25
2.4.	Software	26
2.5.	Oligonukleotide	26
2.6.	Plasmide	28
2.7.	Antikörper und Proteine	29
2.7.1.	Antikörper für die Durchflusszytometrie	29
2.7.2.	Primärantikörper für Immunoblots	30
2.7.3.	Sekundärantikörper für Immunoblots	30
2.7.4.	Verwendete Proteine	30
2.8.	Längenstandards	30
2.8.1.	DNA-Standards	30
2.8.2.	Proteinstandards	30
2.9.	Methoden der Zellbiologie	31
2.9.1.	Zellkultur	31
2.9.2.	Herstellen einer Einzelzellsuspension	31
2.9.3.	Isolation und Kultivierung von murinen Knochenmarkszellen	31
2.9.4.	Infektion von Zelllinien zum <i>in vitro</i> -Nachweis der Oberflächenexpression des MD4 BZR	32
2.9.5.	Transduktion von Knochenmarkszellen für retroviralen Gentransfer	32
2.9.6.	Kultur und Kryokonservierung von Zelllinien	33
2.10.	Transfektion von Zelllinien	34
2.10.1.	Calciumphosphat-Transfektion	34
2.10.2.	Lipofectamine™-Transfektion	35
2.11.	Zell-Lyse für Western Blot (ECL)	36
2.12.	Durchflusszytometrie und FACS	36
2.12.1.	Lebend-Tot-Ausschluss	36
2.12.2.	Oberflächenfärbung	36
2.12.3.	Intrazelluläre Färbung	37
2.12.4.	Sortierung mittels MACS	38
2.12.5.	Sortierung Lysozym-spezifischer Zellen mittels FACSAria	38
2.13.	Tierversuche	39
2.13.1.	Applikation des 5-Fluorouracil (5-FU)	39
2.13.2.	Lethale Bestrahlung der Empfängermäuse	39

2.13.3.	Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfängermause	40
2.14.	Molekularbiologische Methoden	40
2.14.1.	Isolation von Gesamt-RNA	40
2.14.2.	Isolation genomischer DNA	40
2.14.3.	cDNA-Herstellung (reverse Transkription)	41
2.14.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.14.5.	Rapid Amplification of cDNA-Ends with Polymerase Chain Reaction (RACE-PCR)	42
2.14.6.	5' und 3' <i>Nested</i> RACE	42
2.14.7.	Klonierung und Analyse von DNA	42
2.14.7.1.	TOPO® TA Cloning®	42
2.14.7.2.	ColonyPCR	43
2.14.7.3.	Restriktion von DNA	43
2.14.7.4.	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese	43
2.14.7.5.	Gelelution von DNA-Fragmenten	44
2.14.7.6.	Ligation	44
2.14.7.7.	Konzentrationsbestimmung von DNA	44
2.14.7.8.	DNA-Sequenzierung	44
2.15.	Kultur, Transformation und Kryokonservierung von Bakterien	45
2.15.1.	Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien	45
2.15.2.	Erzeugung kompetenter Bakterien und Transformation	45
2.15.3.	Plasmidisolation aus <i>E.coli</i> (DNA-Mini-/Maxipräparation)	46
2.16.	Proteinbiochemische Methoden	46
2.16.1.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels BCA	46
2.16.2.	SDS-PAGE	46
2.16.3.	Transfer und Immunoblot (Western Blot)	47
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Klonierung des rekombinanten MD4 B-Zell-Rezeptors	48
3.1.1.	Isolierung Antigen-spezifischer B-Zellen aus MD4 BZR-transgenen Mäuse	50
3.1.2.	5' und 3' RACE PCR der HEL-spezifischen IgH- und IgL-Ketten zur Erzeugung von <i>full length</i> Sequenzinformationen	51
3.1.3.	Generierung von <i>full length</i> Klonen für die MD4-spezifische Ig μ _{mem} - und Ig κ -Kette	55

3.1.4.	Anfügen der <i>self-cleaving</i> 2A-Peptidsequenz und von Restriktionsschnittstellen an die <i>full length</i> MD4 Ig μ _{mem} - und Ig κ -Klone	56
3.1.5.	Generierung des rekombinanten MD4 BZR _s und Ligation in den retroviralen Zielvektor	57
3.2.	<i>In vitro</i> Nachweis der vom FMDV-2A-Peptid vermittelten Spaltung	59
3.3.	Generierung von <i>Producer</i> zellen und Austestung der virushaltigen Überstände durch Infektion von NIH/3T3-Zellen	61
3.4.	Expression des rekombinanten MD4-BZR _s in einer BZR-defizienten Zelllinie	62
3.5.	Generierung von OTII-T-Zell-Rezeptor retrogenen Mäusen	66
3.6.	Optimierung der <i>in vitro</i> Kulturbedingungen der Donor-Knochenmarksstammzellen	68
3.7.	Generierung MD4 B-Zell-Rezeptor-retrogener Mäuse	73
3.7.1.	Analyse der transduzierten Donorstammzellen für die Rekonstitution der Empfänger _m äuse	73
3.7.2.	Rekonstitution von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen mit retrogen transduziertem Knochenmark	76
3.7.3.	Rekonstitution von <i>Rag</i> ^{-/-} Mäusen mit retrogen transduziertem Knochenmark	81
4.	Diskussion	85
4.1.	Zusammenfassung	85
4.2.	<i>In vitro</i> Nachweis der vom FMDV-2A-Peptid vermittelten Spaltung	86
4.3.	Expression des rekombinanten MD4 BZR _s in einer BZR-defizienten Zelllinie	87
4.4.	Generierung von OTII-T-Zell-Rezeptor retrogenen Mäusen	88
4.5.	Optimierung der <i>in vitro</i> Kulturbedingungen der Donor-Knochenmarksstammzellen	89
4.6.	Generierung MD4-retrogener Mäuse	90
4.7.	Ausblick	94
	Anhang	96
	Literaturverzeichnis	125

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.	Die Stadien der B-Zell-Entwicklung	3
Abb. 2.	Durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen nicht-transgener, Ig-transgener (MD4) und doppelt-transgener (MD4xHEL) Tiere	8
Abb. 3.	Experimenteller Ablauf der Generierung retrogener Mäuse	13
Abb. 4.	Verbleib des 2A-Peptids nach ko-translationaler Spaltung am C-Terminus des stromaufwärts gelegenen Proteins	16
Abb. 5.	Klinischer Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis	20
Abb. 6.	Schematische Darstellung der rekombinanten MD4 Expressionskassette	49
Abb. 7.	Isolierung Ag-spezifischer B-Lymphozyten aus MD4-transgenen Splenozyten	51
Abb. 8.	Klonierungsstrategie des rekombinanten MD4 B-Zell-Rezeptors	52
Abb. 9.	5'(<i>Nested</i>)- und 3'RACE PCR-Reaktionen zur Generierung von <i>full length</i> Sequenzinformationen für die Lysozym-spezifischen Ig-Ketten	54
Abb. 10.	Generierung von <i>full length</i> Klonen für die MD4-spezifische Igκ- und Igμ _{mem} - Kette	55
Abb. 11.	Anfügen der 2A-Peptidsequenz an die <i>full length</i> Sequenzen der Igκ- und Igμ _{mem} -Klone	56
Abb. 12.	Generierung des rekombinanten MD4 BZR	58
Abb. 13.	Verifizierung der vom 2A-Peptid-vermittelten Spaltung in CHO-K1 Zellen	60
Abb. 14.	Generierung von virushaltigen Überständen	62
Abb. 15.	<i>In vitro</i> -Expression des rekombinanten MD4 BZR	64
Abb. 16.	Generierung OTII TZR retrogener Mäuse	67
Abb. 17.	Austestung unterschiedlicher <i>in vitro</i> Kulturbedingungen für eine optimierte Infektion der Donor-Knochenmarksstammzellen	70
Abb. 18.	Infektion des Spender-Knochenmarks	74
Abb. 19.	Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse (C57BL/6 Wildtyp) zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens	77
Abb. 20.	Rekonstitution von Wildtyp-Mäusen mit transgenem MD4 Knochenmark	80
Abb. 21.	Analyse der MD4 retrogenen Mäuse (<i>Rag</i> -defizient) zeigt schwache Expression des Retrogens	83
Abb. A1.	Screen der Transformanten nach 5' <i>Nested</i> RACE	96
Abb. A2.	Screen der Transformanten nach 3'RACE	98
Abb. A3.	<i>In silico</i> generierte <i>full length</i> Sequenz für die Lysozym-spezifische IgH-Kette	100

Abb. A4.	<i>In silico</i> generierte <i>full length</i> Sequenz für die Lysozym-spezifische Igκ-Kette	102
Abb. A5.	Screen der Transformanten zur Identifizierung von <i>full length</i> Igμ _{mem} -Klonen	103
Abb. A6.	Screen der Transformanten zur Identifizierung von Igκ <i>full length</i> Klonen	104
Abb. A7.	Screen der Transformanten nach Anfügen der Furin-FMDV-2A-Proteasesequenz an die <i>full length</i> Igμ _{mem} -Kette	105
Abb. A8.	Screen der Transformanten nach Anfügen der FMDV-2A-Proteasesequenz an die <i>full length</i> Igκ-Kette	106
Abb. A9.	Plasmidkarte des rekombinanten MD4 BZR _s im retroviralen Zielvektor pR1330	107
Abb. A10.	Generierung OTII TZR retrogener Mäuse (Lymphknoten)	108
Abb. A11.	Gating-Strategie zur Analyse der MD4 retrogenen Mäuse	109
Abb. A12.	Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens in den Lymphknoten	110
Abb. A13.	Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens im Knochenmark	113
Abb. A14.	Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens im Blut	115
Abb. A15.	Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse (<i>Rag</i> ^{-/-}) zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens im Knochenmark	117
Abb. A16.	Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse (<i>Rag</i> ^{-/-}) zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens im Blut	119
Abb. A17.	Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse (<i>Rag</i> ^{-/-}) zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens in den Lymphknoten	122
Abb. A18.	Verwendete DNA-Größenstandards (GENECRAFT)	123
Abb. A19.	Verwendete DNA-Größenstandards (GeneRuler™, FERMONTAS/THERMOSCIENTIFIC)	123
Abb. A20.	Verwendeter Protein-Größenstandard	124

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.	Übersicht der meist verwendeten 2A-Peptide	17
Tab. 2.	Verwendete Zelllinien und ihre Wachstumsbedingungen	22
Tab. 3.	Zur Genotypisierung, Klonierung und Sequenzierung verwendete Primer	26
Tab. 4.	Antikörper für die Durchflusszytometrie	29

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-FU	5-Fluorouracil (Pyrimidinanalogon; Zytostatikum)
aa	<i>amino acid</i> – Aminosäure
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	<i>antigen presenting cell</i> – (professionelle) Antigen-präsentierende Zelle
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> – komplementäre DNA
CFA	<i>complete Freund's adjuvant</i> – komplettes Freund'sches Adjuvanz
CHO-K1	<i>chinese hamster ovary</i> – immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des Chinesischen Hamsters
D	<i>diversity</i> – Diversität
(d)dH ₂ O	(doppelt) destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>acid</i>)
E2A	<i>Equine Rhinitis A Virus</i> (ERAV) – 2A-Proteasesequenz
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
<i>E.coli</i> DH5α	<i>Escherichia coli</i> , Spezies DH5α, Klonierungsstamm
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F2A	<i>Foot-and-Mouth Disease Virus</i> (FMDV) – 2A-Proteasesequenz
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FL	<i>full length</i>
Flt3-L	<i>FMS-like tyrosine kinase 3 ligand</i>
FMDV	<i>Foot- and-Mouth Disease Virus</i> – Maul-und-Klauenseuche-Virus
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
h	<i>hour</i> – Stunde
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HEK293T	<i>human embryonic kidney</i> , humane embryonale Nierenzelllinie, die das SV-40 T-Antigen exprimiert
HEL	<i>Hen Egg Lysozyme</i> – Hühnereiweiß
HeLa	immortalisierte, humane Epithel-Zelllinie, generiert aus dem Zervixkarzinom von Henrietta Lacks
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i> – hämatopoietische Stammzelle
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IgD	Immunglobulin D

IgH	schwere Immunglobulinkette (<i>heavy</i>)
Igκ	kappa leichte Immunglobulinkette
IgL	leichte Immunglobulinkette (<i>light</i>)
Igμ	schwere Immunglobulinkette des IgM-Isotyps
IgM ^(a)	Immunglobulin M, a-Allotyp (transgen)
IgM ^(b)	Immunglobulin M, b-Allotyp (endogen)
IL	Interleukin
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> – interne ribosomale Eintrittsstelle
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
J	<i>joining</i> – Verbindung
kDa	Kilodalton, Einheit der Molekülmasse
L	Leiter, i.e.S. DNA-Leiter (Größenstandard)
LT-α	Lymphotoxin-α
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LTR	<i>long-term repopulating</i>
mcs	<i>multiple cloning site</i>
MD4	HEL-BZR transgene Founderlinie, die sowohl HEL-spezifische IgM als auch IgD-Antigenrezeptoren trägt
MESV	<i>Murine embryonic stem cell virus</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> – mittlere Fluoreszenzintensität
MHCII	<i>Major Histocompatibility Complex class II</i> - Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MLV	<i>Murine leukemia virus</i> – murines Leukämievirus
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MPSV	<i>Myeloproliferative sarcoma virus</i> – Myeloproliferatives Sarkomavirus
mRNA	messenger RNA – Boten-RNA
MS	Multiple Sklerose
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nt	Nukleotide
ORF	<i>open reading frame</i> – offenes Leseraster
P2A	<i>Porcine Teschovirus-1</i> (PTV) – 2A-Proteasesequenz
PE	Phycoerythrin
pi	Propidiumiodid
p.i.	post-Infektion
RACE	<i>rapid amplification of complementary cDNA ends</i>
Rag-1, -2	<i>recombination activating gene</i> – Rekombinationsaktivierendes Gen-1, -2
RNA	Ribonukleinsäure (<i>acid</i>)
RSS	Rekombinationssignalsequenz
SCA1	<i>stem cell antigen 1</i> – Stammzellantigen
SCF	<i>stem cell factor</i> - Stammzellfaktor
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i> – schwerer kombinierter Immundefekt
sek	Sekunde
SPF	spezifiziert pathogen-frei
ss	single stranded – einzelsträngig

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

T	Temperatur [°C]
t	<i>time</i> – Zeit [sek oder min]
T2A	<i>Thosea asigna Virus</i> (TaV) – 2A-Proteasesequenz
T _{Anneal}	Annealingtemperatur
t _{Elong}	Elongationszeit
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TZR	T-Zell-Rezeptor
TZRV α 2	T-Zell-Rezeptor-Kette V α 2
TZRV β 5.1/2	T-Zell-Rezeptor-Kette V β 5.1/2
U	<i>Unit</i> (Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V	<i>variable</i> – Variabilität
VEGFR2	<i>vascular endothelial cell growth factor receptor-2</i>
VPg	<i>viral protein genome-linked</i>
ZKBS	Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ein Expertengremium vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit)
ZNS	Zentrales Nervensystem

ZUSAMMENFASSUNG

Die Generierung retrogener Mäuse wurde erstmals im Jahr 2006 von Holst et al. für TZR beschrieben. Wir waren jedoch an der Generierung B-Zell retrogener Mäuse mit dem Ziel interessiert, die Bedeutung Antigen-spezifischer B-Lymphozyten im Modell der G6PI-induzierten Arthritis näher zu untersuchen. Aus eigenen Vorarbeiten wissen wir, dass sowohl B- als auch T-Lymphozyten für die Induktion der Erkrankung in den suszeptiblen Stämmen DBA/1 und SJL notwendig sind. Mithilfe der G6PI-BZR retrogenen Mäuse sollte dabei im Speziellen analysiert werden, in welcher Funktion die B-Lymphozyten zur Arthritis-Pathogenese beitragen: ob als professionelle APZ, als Produzenten von (Auto-) AK oder als Zytokinproduzenten. Als Modell-BZR für die erstmalige Generierung BZR retrogener Mäuse entschieden wir uns für den gut charakterisierten Lysozym-spezifischen BZR MD4, einem membrangebundenem IgM ($Ig\mu_{mem}$). Eine MD4 transgene Linie wurde in den 1980er Jahren von C.C. Goodnow generiert. Diese MD4 transgene Linie wurde vergleichend zur Analyse der in dieser Arbeit generierten MD4 retrogenen Mäusen herangezogen. Der Vergleich sollte dazu dienen, diese neuartige Methode besser einzuschätzen und ihre Anwendbarkeit beurteilen zu können.

Allgemein können mithilfe der retrogenen Methode zwei oder mehr Proteine von einem über ein 2A-Peptid verbundenen, multizistronischen retroviralen Vektor durch retroviral-vermittelten Stammzellgentransfer in Mäusen exprimiert werden. Dabei ermöglicht das selbst-spaltende 2A-Peptid die stöchiometrische Expression der Zielproteine, was vor allem bei ko-exprimierten Molekülen von enormer Bedeutung ist.

Für die Generierung der MD4 retrogenen Mäuse, wurden die Antigen-spezifischen B-Zellen aus den MD4 transgenen Mäusen isoliert und ihre cDNA als Template für die Klonierung des rekombinanten BZR verwendet. Dabei wurden die Lysozym-spezifische $Ig\mu_{mem}$ - und $Ig\kappa$ -Kette über eine Furin- und nachfolgende FMDV-2A-Peptidsequenz miteinander verbunden. Nach ko-translationaler Spaltung sollte der rekombinante MD4 BZR ohne weitere Sequenzanhänge vorliegen und die korrekte Insertion in der Zellmembran nicht behindern. Das rekombinante Konstrukt wurde schließlich in das retroviral-basierende Zielplasmid ligiert. Die Effizienz der vom Furin bzw. der 2A-Protease vermittelten Spaltung wurde im Western Blot mit μ H- und κ -spezifischen Antikörpern untersucht. Dabei konnte neben gespaltenem auch ungespaltenes Produkt detektiert werden. Weiterhin konnte der retrogene MD4 BZR erfolgreich auf der Zelloberfläche der *rag*-defizienten Pro-B-Zelllinie R5B exprimiert werden. Die Analyse der rekonstituierten Wild-

typ-Mäuse zeigte, dass der retrogene MD4 BZR vorwiegend intrazellulär, nicht jedoch auf der Zelloberfläche der B-Lymphozyten exprimiert wurde. Darüber hinaus konnten IgM^{b+}eGFP⁺-Zellen detektiert werden, die vermutlich chimäre Rezeptoren darstellen. Schließlich wurden *Rag*^{-/-} Mäuse mit dem retrogenen BZR rekonstituiert, um eine mögliche Konkurrenz mit endogenen BZRs sowie die Bildung chimärer Rezeptoren zu unterbinden. Hier konnte der retrogene MD4 BZR in nur geringer Frequenz intrazellulär und – in Übereinstimmung mit dem vorherigen Ergebnis – nicht auf der Zelloberfläche der analysierten B-Lymphozyten detektiert werden.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Doktorarbeit versucht, die neuartige Methode der Generierung retrogener Mäuse auf B-Zell-Rezeptoren anzuwenden. Jedoch scheint dieser Ansatz zur *in vivo* Expression von B-Zell-Rezeptoren nicht geeignet zu sein.

SUMMARY

The generation of retrogenic mice has been previously described for various T cell receptors and was originally reported in 2006 by Holst et al. We were especially interested in the generation of BCR retrogenic mice to further investigate the role and importance of antigen-specific B cells in the G6PI-induced arthritis model, where B (and T) cells are necessary for disease induction. To determine if the retrogenic approach is also suitable for the generation of B cell retrogenic mice, we set out to generate a novel mouse model using well characterized BCRs such as anti-HEL MD4. We assumed that analysing these B cell retrogenic mice would help to evaluate and to better understand this novel technique, as their transgenic counterparts are well characterized, e.g. in aspects of tolerance induction. By using the retrogenic approach, two or more proteins can be expressed from a single 2A peptide-linked multicistronic retroviral vector in mice through retrovirus-mediated stem cell gene transfer, while the 2A peptide allows for the stoichiometric expression of target proteins which is crucial for protein coexpression. Attempting to generate anti-HEL IgM_{membrane} (Igμ_{mem}) retrogenic mice, MD4 transgenic B cells were isolated and their cDNA was used as template for cloning of the recombinant MD4. The HEL-specific Igκ and Igμ_{mem} chains were linked via a furin cleavage site followed by a 2A peptide sequence (derived from Foot-and-Mouth-Disease-Virus) to build recombinant MD4 that was ligated into a retroviral based target vector. Western Blot analysis using κ- and μ-chain specific antibodies showed correct cleavage of the furin – 2A peptide. Furthermore, we could show *in vitro* surface expression of the recombinant anti-HEL Igμ_{mem} BCR by transducing the *rag*-deficient cell line R5B. By reconstituting wildtype mice, we were only able to detect the retrogenic BCR intracellularly but not on the surface of B cells. Finally, we reconstituted *rag*^{-/-} mice to assess the expression of the retrogenic MD4 BCR in these mice and to rule out possible competition by endogenous BCRs. From our findings, the retrogenic MD4 BCR was detectable in very low frequencies intracellularly and absent on the surface of the analysed cells comparable to our previous results.

Overall in this thesis we aimed at generating a novel BCR retrogenic mouse model and for the first time demonstrate that retrogenic technology may not be an appropriate tool for BCR-expression *in vivo*.

DANKSAGUNG

Louis Pasteur sagte treffend: „Eine wissenschaftliche Entdeckung ist nie die Arbeit von nur einer Person“ – in diesem Sinne möchte ich mich von ganzem Herzen bei all jenen bedanken, die mich auf diesem langen Weg begleitet und unterstützt haben.

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Kamradt für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, seine hervorragende Betreuung und die langjährige uneingeschränkte Unterstützung bedanken, vor allem aber für seinen Mut sich auf ein Projekt mit den doch nicht so „boring B cells“ einzulassen. Prof. Dr. Berit Jungnickel danke ich für die fachliche Unterstützung in Klonierungsfragen und die Bereiterklärung zur Erstellung eines Gutachtens. Bei Prof. Dr. Hans-Martin Jäck möchte ich mich sehr herzlich für die enorme fachliche und methodische Unterstützung, die er mir während der gesamten Zeit entgegengebracht hat sowie unsere menschlich sehr bereichernden Gespräche bedanken.

Meinem jetzigen Arbeitgeber, Prof. Dr. Tim Sparwasser, bin ich sehr für sein entgegengebrachtes Vertrauen und die weitreichenden Freiräume dankbar, diese Dissertation zu Ende bringen zu können.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Annett Krause – ohne jegliche Übertreibung kann ich sagen, dass Du die Beste bist! Ebenso aufrichtig möchte ich mich bei Karin Müller für die unzähligen PCRs und DNA-Präps sowie die vielen unterhaltsamen Stunden im Labor bedanken. Olga Rudeschko, Christine Baier und Freya Rost möchte ich dafür danken, dass sie stets das Unmögliche möglich gemacht haben. Manu Neumann gilt mein Dank für die unendlich vielen, gemeinsamen Tage der Hybridom(sub-)klonierung und vor allem dafür, dass Du immer den Überblick bewahrt hast!

Bei Edith Roth und Dr. Jürgen Wittmann in Erlangen möchte ich mich herzlich für die tatkräftige Unterstützung bei Experimenten vor Ort aber auch aus der Ferne bedanken.

Dr. Michael Van der Wall und seinem Team vom IVTK Jena danke ich für die hervorragende Fürsorge und Pflege meiner „Shakespeare“-Mäuse, im besonderen Birgit Meißner (ich hoffe, Du hältst deinen „Superwoman“-Umhang weiterhin bereit?!) sowie Petra Schroth und Regina Zapfe.

Meinen Kollegen Chrissi Göpfert, Franzi Weber, Dr. Sebastian Drube, Dr. Jörg Stirnweiß, Dr. Ingo Irmeler, Dr. Katharina Ferrari-Kühne und Martin Böttcher bin ich für die kritischen Diskussions- und oft sehr unterhaltsamen Kaffeerunden zu Dank verpflichtet. Ein besonderes Dankeschön geht an die „Cloning Queen“ Dr. Sylvia Heink. Ihr verdanke

ich meine Leidenschaft für die Molekularbiologie und all mein Geschick im Umgang mit „dem unsichtbaren Molekül“.

Bei meinen lieben Kolleginnen, die das Institut leider vor mir verlassen haben, Dr. Lisa Bruns, Dr. Anne Taubner, Dr. Luli Berod, Tina Heinemann, Maria Eschke, Birgit Lehmann, Rike Schmitz, bedanke ich mich für die tolle gemeinsame Zeit im – aber auch außerhalb – des Labors! Chrissi und Franzi danke ich für die regelmäßigen und oft so spontanen „Das hätt’s bei Jane Austen nie gegeben!“-Filmabende. Ich vermisse sie sehr! Bei Dini möchte ich mich für die überaus unterhaltsamen Abende außerhalb der Immunologie bedanken!

Meiner „Schwester“ danke ich von Herzen für die unvergessliche gemeinsame Zeit in Jena – Danke, dass Du die morgendliche Stille immer gefüllt hast. Danke auch, dass wir uns immer gegenseitig ermuntert und ermutigt haben und überhaupt, herzlichen Dank, dass es Dich gibt.

Meiner „argentinischen Schwester“ danke ich ebenso von Herzen für die gemeinsame Zeit in Jena und nun in Hannover – danke, dass Du immer für mich da bist und ich wann immer ich mag Platz auf Eurer Couch finde.

Schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner „Kern-Familie“ – Astrid, Ralf & Andrea, Luise, Jürgen & Anita – für die fortwährende Unterstützung, das permanente Interesse an „den Mäusen“ und Euer enormes Verständnis bedanken.

Nicht in Worte fassen kann ich die unendlich große Dankbarkeit, die ich für Alex empfinde. Ich danke Dir mehr als von Herzen für Deine Ruhe, Gelassenheit und Geduld in den letzten Jahren als Du mit mir die Höhen und Tiefen dieser Arbeit durchlebt und dabei stets auf eine sehr einfühlsame Weise aufmunternde Worte gefunden hast.

1. EINLEITUNG

B-Lymphozyten stellen gemeinsam mit den T-Lymphozyten die Zellen des adaptiven Immunsystems dar. Die B-Zellen besitzen als einzige Zellen des Immunsystems die Fähigkeit zur Antikörperproduktion und sind daher von entscheidender Bedeutung bei der Abwehr von Pathogenen (humorale Immunantwort). Die Bezeichnung dieser Lymphozytenpopulation als „B-Zellen“ geht ursprünglich auf die *Bursa Fabricii*, einem lymphatischen Organ in Vögeln, zurück. Das Knochenmark stellt das Bursa-Äquivalent in Säugern dar (Ratcliffe 2006); der Buchstabe B erhielt daher nachträglich die Bedeutung *bone marrow* (engl. für Knochenmark).

1.1. Funktionen der B-Lymphozyten

B-Lymphozyten übernehmen drei wesentliche Funktionen im Immunsystem: (1) die Produktion von Antikörpern, (2) die Präsentation von Antigenen und (3) die Produktion von Zytokinen.

Antikörper (AK) sind die Haupteffektoren der humoralen Immunantwort und stellen die lösliche Form des klonalen Antigenrezeptors (B-Zell-Rezeptor, BZR) dar. Somit setzen sie sich wie auch der BZR aus je zwei gepaarten schweren und leichten Immunglobulinketten (Ig-Ketten), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, zusammen. Die schweren und leichten Ketten lassen sich wiederum in eine aminoterminal variable Region (hier erfolgt die Antigenbindung) und eine carboxyterminale konstante Region unterteilen. Letztere vermittelt die Effektormechanismen der Immunglobuline. Antikörper unterscheiden sich von der membrangebundenen Variante in ihrem hydrophilen (anstelle eines hydrophoben) Carboxyterminus. Sie werden vorwiegend von terminal differenzierten Plasmazellen produziert. Diese entwickeln sich (neben den Gedächtnis-B-Zellen) in den Keimzentren der Milz aus den follikulären B-Zellen. Hypermutationen in den variablen Regionen der Ig-Ketten führen zu einer zusätzlichen Diversifikation des Ig-Repertoires. In der Folge können Antikörper mit verringerter oder erhöhter Affinität für ein gegebenes Antigen produziert werden. Gleichzeitig wechseln die Immunglobuline ihre konstanten Regionen (sog. Isotyp- oder Klassenwechsel), und es werden anstelle von IgM die Isotypen IgG, IgE oder IgA produziert.

Neben Dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) und Makrophagen zählen die B-Lymphozyten zu den sog. professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs), da sie in der Lage sind, den T-Helferzellen (T_H-Zellen) Antigene zu präsentieren. Die Präsentation erfolgt über den Haupthistokompatibilitätskomplex vom Typ II

(*major histocompatibility complex class II*, MHCII). Die Beladung des MHCII-Komplexes mit Antigen erfolgt bei allen professionellen APCs nach dem gleichen Prinzip (Kurosaki, Shinohara et al. 2010, Neeffjes, Jongsma et al. 2011). Wird das präsentierte Peptid von den CD4⁺ T-Zellen erkannt, binden diese spezifisch mit ihrem T-Zellrezeptor (TZR) an den Peptid:MHCII-Komplex. Sofern auch die für die T-Zell-Aktivierung notwendigen kostimulatorischen Signale (sog. 2. und 3. Signal) übermittelt werden, setzt dies eine intrazelluläre Signalkaskade sowie ein komplexes Differenzierungs-/Effektorprogramm in den T-Zellen in Gang. Gleichzeitig induzieren die von den T_H-Zellen produzierten Effektorzytokine zunächst die Proliferation Antigen-bindender B-Zellen und schließlich den Klassen- bzw. Isotypwechsel.

Eine weitere bedeutende Funktion der B-Lymphozyten besteht in der Produktion von Zytokinen, wodurch andere Zellen des Immunsystems (z.B. T_H-Zellen) beeinflusst werden können. Die Zytokinproduktion erfolgt entweder konstitutiv oder als Reaktion auf Antigenkontakt, *Toll-like* Rezeptor (TLR)-Liganden, T-Zellen (nach CD40 – CD40L- Interaktion) bzw. auf eine Kombination dieser Stimuli (Lund and Randall 2010). Zu den von B-Lymphozyten produzierten Zytokinen zählen Interleukin-(IL-)1, IL-6, IL-10, IL-17 sowie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Lymphotoxin (LT)- α und der Wachstumsfaktor *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF).

1.2. B-Zell Entwicklung

In Säugern entwickeln sich B-Lymphozyten während eines komplexen Differenzierungsprozesses vor der Geburt in der fetalen Leber sowie nach der Geburt im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen (HSCs – *hematopoietic stem cells*, **Abb. 1**) (Hardy, Li et al. 2000, King and Goodell 2011, Pieper, Grimbacher et al. 2013). Diese Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche das Stammzellantigen-1 (*stem cell antigen*, SCA1) und die Tyrosinkinase c-Kit (CD117), jedoch keine Oberflächenmarker, die normalerweise von Zellen der hämatopoietischen Linie exprimiert werden; sie werden daher als *Lineage-negative* (Lin⁻) bezeichnet (Wilson and Trumpp 2006). HSCs sind funktional charakterisiert durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung über die Lebensdauer eines Organismus sowie durch die Langzeit-Repopulation aller Blutzell-Linien (*long-term repopulating* (LTR) *activity*). Damit sich aus den hämatopoietischen Stammzellen die ersten B-Zell-Vorläufer entwickeln können, ist innerhalb des Knochenmarks ein spezifisches Milieu erforderlich, die Stammzell-Nische (*stem cell niche*).

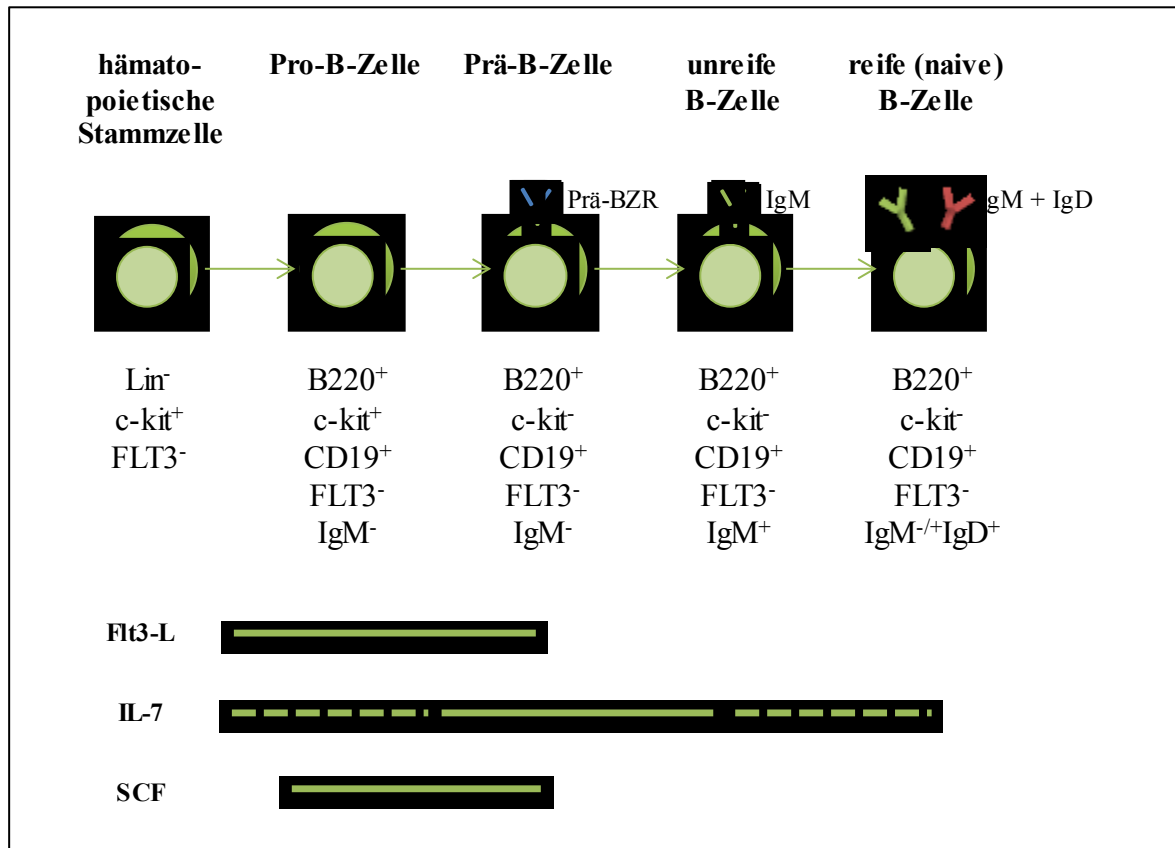


Abb. 1. Die Stadien der B-Zell-Entwicklung. Eigene Darstellung basierend auf (Nagasawa 2006, King and Goodell 2011).

1.2.1. Die Stadien der (murinen) B-Zellentwicklung

Bereits früheste B-Zell-Vorläufer exprimieren das Leukozytenantigen CD45 (B220 in der Maus) auf ihrer Oberfläche. Basierend auf der Expression von B220 sowie weiterer Oberflächenmarker wurden von Hardy et al. die B-Zell-Vorläuferstadien im Knochenmark identifiziert und als HARDY-Fraktionen (A, B, C, C', D und E) beschrieben (Hardy, Li et al. 2000, Nagasawa 2006). Diese frühesten B-Zell-Vorläufer haben weiterhin gemeinsam, dass sie kein Oberflächenimmunglobulin exprimieren (IgM⁻). Fraktion A-Zellen stellen nach dieser Gruppierung die früheste Entwicklungsstufe dar (Prä-pro B-Zellen), aus der sich alle weiteren Stadien bzw. Fraktionen entwickeln. In Prä-pro B-Zellen konnten große Mengen an IgH μ -Keimbahn-Transkripten sowie geringe Transkriptmengen an den V(D)J-Rekombinaseproteinen *Rag-1* und *Rag-2* (Rekombinationsaktivierende Gene-1 und -2) nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass bis zu diesem Stadium der B-Zell-Entwicklung noch keine Umlagerung der Immunglobulinkettengene stattfindet bzw. stattgefunden hat (Hardy, Li et al. 2000), und dass somit die Entwicklung dieser frühen Stadien sehr wahrscheinlich unabhängig von der Umlagerung der Ig-Kettengene erfolgt.

Die Umlagerungen der Immunglobulinkettengene, auch als V(D)J-Rekombination bezeichnet, werden vom *Rag-1/Rag-2*-Proteinkomplex eingeleitet. Dieser Komplex erzeugt DNA-Doppelstrangbrüche zwischen den Ig-Gensequenzen und sog. Rekombinationssignalsequenzen (RSS). Die RSS stellen konservierte, heptamere Palindromsequenzen dar, die unmittelbar an die kodierenden Gensegmente (VDJ) anschließen und durch 12- oder 23-basenpaar lange Abstandhalter (sog. *Spacer*) von ebenfalls konservierten Nonamersequenzen getrennt sind. Gespaltene DNA-Enden werden von einem ubiquitären Set an *non-homologous end joining proteins* verbunden (u.a. DNA-Ligase IV), welche DNA-Doppelstrangbrüche unabhängig von Sequenzhomologien reparieren (Herzog, Reth et al. 2009).

Die Umlagerung der Gensegmente erfolgt zunächst am Locus für die schweren Immunglobulinketten (IgH) zwischen den D_H- und J_H-Gensegmenten während der frühen Pro-B-Zellphase (Fraktion B) und im V_H-Gensegment während der späten Pro-B-Zellphase (Fraktion C). Produktive *in frame* Genumlagerungen führen zur Expression der Ig μ -Kette auf der Oberfläche der großen Prä-B-Zellen (Fraktion C') in Form des Prä-B-Zell-Rezeptors (Prä-BZR). Der Prä-BZR besteht aus zwei rearrangierten schweren μ -Ketten sowie zwei leichten Ersatzketten (SLC – *surrogate light chain*), die sich aus den in Pro-B-Zellen synthetisierten Peptidketten $\lambda 5$ und VpreB zusammensetzen und nicht kovalent gepaart sind (Hardy, Li et al. 2000, Lanig, Bradl et al. 2004, Vettermann and Jäck 2010). Für die Weiterleitung der Signale benötigt der Prä-BZR (wie auch der später exprimierte BZR) zwei weitere Proteine: die Ig- α und die Ig- β -Kette. Dies sind über Disulfidbrücken verbundene Transmembranproteine, die nichtkovalent an den (Prä-)BZR binden und durch die Phosphorylierung der ITAM-Motive in ihrem zytoplasmatischen Teil eine Signalkaskade auslösen (Parkhouse, Preece et al. 1992, Dylke, Lopes et al. 2007).

Die Expression des Prä-BZRs auf der Oberfläche der großen Prä-B-Zellen hat mehrere Konsequenzen. Ob diese biologischen Konsequenzen alleinig durch die Oberflächenexpression des Prä-BZRs oder durch Kreuzvernetzung (sog. *Crosslinking*) des Prä-BZRs mit einem unbekannten Liganden hervorgerufen wird, ist bislang unbekannt. So führt das *Signalling* über den Prä-BZR einerseits zu mehreren Runden der Zellteilung, mit dem Ziel, die Zellen mit erfolgreicher Umordnung des IgH-Locus zu vermehren (sog. klonale Expansion). Zum anderen initiiert das Prä-BZR-Signalling die Herunterregulierung der $\lambda 5$ -Gene, wodurch die Expression der SLC beendet wird (Herzog, Reth et al. 2009). Weiterhin verlieren die sich entwickelnden B-Zellen ihre IL-7-Abhängigkeit; die Expression des IL-7-Rezeptors (IL-7R) wird in den nachfolgenden Entwicklungsstadien herunterreguliert.

Schließlich verbleiben die großen Prä-B-Zellen nach mehreren Runden der Zellteilung in der G1-Phase des Zellzyklus und werden zu kleinen Prä-B-Zellen (Kurosaki, Shinohara et al. 2010). Somit stellt die Expression des Prä-BZRs einen wichtigen Kontrollpunkt in der Entwicklung der B-Lymphozyten dar. Die vom Prä-BZR übermittelten Signale geben eine rasche Reaktion auf die erfolgreiche Umlagerung der *Ig μ* -Gene, denn nur Prä-B-Zellen mit intaktem Prä-BZR können sich weiter differenzieren. Parallel dazu wird die Umlagerung am zweiten *IgH*-Allel inhibiert. Durch diesen Mechanismus des Allelausschlusses wird gewährleistet, dass jede (reife) B-Zelle nur B-Zell-Rezeptoren einer Spezifität auf ihrer Oberfläche ausprägt (Herzog, Reth et al. 2009, Brady, Steinell et al. 2010, Vettermann and Schlissel 2010, Luning Prak, Monestier et al. 2011).

Bereits von Zellen der nächsten Entwicklungsstufe, den kleinen Prä-B-Zellen (Fraktion D), wird der Prä-BZR nicht mehr exprimiert; gleichzeitig re-exprimieren diese Zellen jedoch die *Rag-1*- und *Rag-2*-Gene (Hardy, Li et al. 2000). In der Konsequenz kommt es zu erneuten Ig-Genumlagerungen: die VJ-Gensegmente im *IgL*-Locus werden rearrangiert. Sobald die Umlagerungen im Locus für die leichten Ig-Kettengene erfolgreich waren, exprimieren die unreifen B-Zellen (HARDY-Fraktion E) als erste Zellpopulation während der gesamten B-Zell-Entwicklung in Form des IgM ein Oberflächenimmunglobulin (Kurosaki, Shinohara et al. 2010). Unreife B-Zellen stellen das letzte Entwicklungsstadium der B-Lymphozyten im Knochenmark dar.

Ist der von den unreifen B-Zellen exprimierte BZR autoreaktiv, d.h. er erkennt körpereigene (Selbst-)Antigene, wird er internalisiert. Gleichzeitig werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, die zu einer verstärkten Expression der *Rag-1*- und *Rag-2*-Gene führt. Die erneute Aktivität der Rekombinationsaktivierenden Gene dient der Umlagerung der *V κ* -Gensegmente, mit dem Ziel die ursprünglich rearrangierten, autoreaktiven *V κ J κ* -Gensegmente zu ersetzen. Dieser Vorgang wird als Rezeptor-Editierung bezeichnet und stellt einen wichtigen Toleranzmechanismus dar (Kurosaki, Shinohara et al. 2010, Luning Prak, Monestier et al. 2011). Ist die sekundäre Umlagerung am *IgL*-Locus produktiv, bildet die unreife B-Zelle auf ihrer Oberfläche einen BZR mit neuer, geänderter Spezifität aus.

In Abhängigkeit von der Affinität des exprimierten BZRs werden die B-Zellen entweder positiv oder negativ selektioniert. Bei ersterem gelangen sie in die Peripherie (z.B. die Milz), um dort auf (Fremd-)Antigene zu treffen; bei negativer Selektion werden sie hingegen noch im Knochenmark eliminiert.

1.2.2. Störungen in der B-Zell-Entwicklung

Die Entwicklung der B-Lymphozyten von den frühesten Vorläuferzellen zur unreifen B-Zelle mit der Expression eines funktionsfähigen BZR auf ihrer Oberfläche ist ein komplexer Prozess, der einer strengen Regulation bzw. Kontrolle bedarf. In der Literatur sind mehrere Störungen beschrieben, die zu einer Blockade der B-Zell-Entwicklung führen [für Ref. u.a. (Vale and Schroeder 2010)]. Beispielsweise besitzen Mäuse, denen eines der beiden Rekombinations-aktivierenden Gene fehlt, *Rag-1*^{-/-} bzw. *Rag-2*^{-/-}, keine reifen Lymphozyten, da die Umlagerung der Gensegmente nicht stattfinden kann. Die Entwicklung der B-Lymphozyten ist im Stadium der Prä-pro-B-Zellen blockiert (Shinkai, Rathbun et al. 1991, Mombaerts, Iacomini et al. 1992). Bei *µmt*-Mäusen ist die B-Zell-Entwicklung ab dem Stadium der Pro-B-Zellen inhibiert, da diese Tiere ein Stopp-Codon im ersten Membran-Exon der *Igµ*-Region tragen. In diesen Tieren können weder *IgM*⁺- noch *IgD*⁺-B-Zellen detektiert werden (Kitamura, Roes et al. 1991, Vale and Schroeder 2010).

Das Fehlen der SLC-Komponente $\lambda 5$ während der B-Zell-Entwicklung führt zu einer Blockade am Übergang vom Pro- zum Prä-B-Zell-Stadium. Dies resultiert in einer drastischen Reduktion an reifen B-Lymphozyten in der Peripherie. Identische Auswirkungen konnten bei Mäusen festgestellt werden, denen die beiden *VpräB*-Isoformen fehlen. Diese Beobachtungen bedeuten allerdings gleichermaßen, dass – im Gegensatz zur *Rag*-Defizienz – die B-Zell-Entwicklung bei Abwesenheit von Bestandteilen der leichten Ersatz-Ig-Kette nicht vollständig gestört ist (Vettermann, Herrmann et al. 2008, Herzog, Reth et al. 2009).

1.2.3. Der Lysozym-spezifische MD4-B-Zell Rezeptor als Modell

Zur Untersuchung von Toleranzmechanismen auf sogenannte Neo-Autoantigene (Toleranzverlust gegenüber Autoantigenen) wurde in den 1980er Jahren die MD4 transgene Linie generiert (Goodnow, Crosbie et al. 1988). Diese Linie trägt rearrangierte schwere und leichte Immunglobulinkettengene, die für einen hoch-affinen anti-Lysozym Antikörper kodieren (Smith-Gill, Wilson et al. 1982, Smith-Gill, Lavoie et al. 1984, Smith-Gill, Mainhart et al. 1984). Diese transgenen Mäuse sind bezüglich des Phänotyps der B-Zellen, ihrer funktionellen Eigenschaften sowie der Toleranzmechanismen außerordentlich gut charakterisiert (Goodnow, Crosbie et al. 1988, Goodnow, Crosbie et al. 1989, Goodnow, Brink et al. 1991, Hartley, Crosbie et al. 1991).

Die Wahl von Lysozym (*hen egg lysozyme*, HEL) als Modellantigen zur Generierung des Transgens erfolgte dabei aus mehreren Gründen; unter anderem ist es *in vivo* nicht to-

xisch. Es scheint daher unwahrscheinlich, dass unspezifische Auswirkungen auf das immunologische Milieu der Empfängermaus zu erwarten sind.

Die genomische DNA des Hybridoms HyHEL-10 (Silverton, Padlan et al. 1984, Smith-Gill, Mainhart et al. 1984) diente als Vorlage (sog. *Template*) zur Generierung von HEL-spezifischen schweren und leichten Immunglobulinkettengenen, da dieses Hybridom Antikörper mit einer sehr hohen Affinität für Lysozym sezerniert ($K_{\text{aff}} = 1,5 \times 10^9/\text{M}$) (Smith-Gill, Lavoie et al. 1984, Smith-Gill, Mainhart et al. 1984, Padlan, Silverton et al. 1989). Die $\gamma 1$ -konstante Region der schweren Kette wurde jedoch durch ein Segment, das den vollständigen μ - und δ -Lokus enthält, ersetzt. Somit wird in den transgenen Zellen die Abfolge von der *IgM-only*-Expression zur IgM-/IgD-Koexpression, wie es auch während der normalen B-Zell Entwicklung zu beobachten ist, gewährleistet (Blattner and Tucker 1984). Da die verwendeten μ - und δ -Loci aus Balb/c-Mäusen (IgH^a-Allotyp) stammen, können sie mithilfe von Allotyp-Antikörpern von endogenen (Wildtyp-)Zellen (IgH^b-Allotyp; C57BL/6) unterschieden werden. Die schweren und leichten Immunglobulinkettengene wurden in befruchtete Eier koinjiziert. Daraus entstanden fünf Linien (MD3 – MD7), die mehrere Kopien des Transgens trugen; die Linie MD4 zeigte dabei die stärkste Expression des Transgens und wurde deshalb für nachfolgende Experimente ausgewählt. In den resultierenden Nachkommen konnten hohe Serumtitern an anti-Lysozym-Antikörpern detektiert werden. Die durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten transgener Tiere ergab, dass mehr als 90% der B-Lymphozyten die schwere Ig-Kette des transgenen a-Allotyps als IgM oder/und IgD auf ihrer Oberfläche exprimierten und von diesen wiederum 60 bis 90% Lysozym gebunden haben (**Abb. 2**). Nur 1 bis 6% der Splenozyten bildeten den endogenen b-Allotyp als IgM oder/und IgD auf ihrer Oberfläche aus (Goodnow, Crosbie et al. 1988).

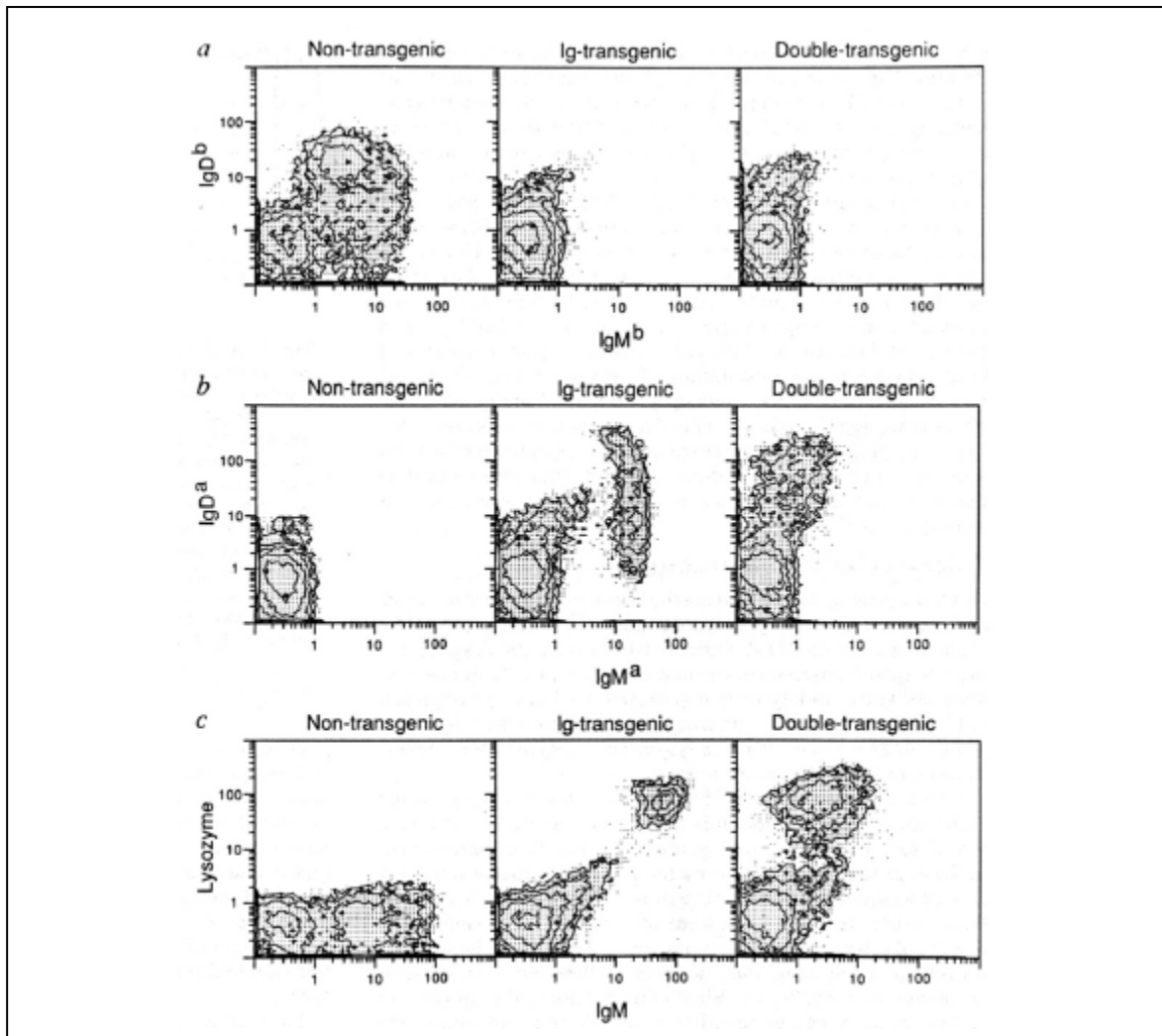


Abb. 2. Durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen nicht-transgener, Ig-transgener (MD4) und doppelt-transgener (MD4xHEL) Tiere. Die Ig- und doppelt-transgenen Mäuse wurden, wie im Text beschrieben, generiert. (A) Die endogenen IgM^b- und IgD^b-schweren Ketten wurden ausschließlich von den nicht-transgenen B-Zellen exprimiert. (B) Die Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten a-Allotyp-spezifischen Antikörpern für IgM und IgD, zeigte in den Ig-transgenen Tieren, dass die transgenen IgM- und IgD-schweren Ketten von über 90% der B-Zellen exprimiert wurden. In den doppelt-transgenen Tieren hingegen konnte vorwiegend IgD auf der Oberfläche der B-Zellen detektiert werden; die IgM-Expression war drastisch reduziert. (C) Zur Identifizierung HEL-bindender B-Zellen wurden die Einzelzellsuspensionen zunächst mit dem Antigen selbst und anschließend mit einem HEL-spezifischen AK (gekoppelt an ein Fluorochrom) inkubiert. Zwischen 60 bis 90% der IgM^a und/oder IgD^a-positiven Zellen konnten Lysozym binden (Goodnow, Crosbie et al. 1988).

Für Toleranzstudien wurde aus der Ig-transgenen MD-4 Linie gemeinsam mit einer weiteren transgenen Linie, die Lysozym in Form eines löslichen Proteins als sog. Neo-Selbstantigen in ihrem Körper exprimiert (jedoch keine Lysozym-spezifischen Serum-AK bildet und somit tolerant für Lysozym ist), eine doppelt transgene Maus generiert (MD4 x sHEL). In diesen doppelt-transgenen Tieren konnten Lysozym-spezifische Antikörper im Serum nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden (Goodnow, Crosbie et al. 1988). Weiterhin war die IgM-Oberflächenexpression auf den B-

Lymphozyten in diesen Tieren drastisch reduziert. Diese verringerte IgM-Expression war spezifisch für IgM, denn das IgD-Expressionsniveau sowie auch das weiterer charakteristischer Oberflächenmarker (wie B220, Mac-1 oder Ly-1) war unverändert. Von Mason et al. wurden weiterführende Studien zur (Selbst-)Toleranz in den Lysozym-transgenen Mäusen durchgeführt. Dabei wurden die Entwicklung und das Überleben der Lysozym-spezifischen B-Zellen in den HEL-Ig-transgenen (MD4) mit den bereits beschriebenen doppelt-transgenen Tieren verglichen. In den MD4 transgenen Tieren erfolgte die B-Zell-Entwicklung, Lokalisierung und Expression der transgen-kodierenden IgM- und IgD-Oberflächenrezeptoren in der gewohnten Abfolge. Die Lysozym-Ig-transgenen Mäuse sind daher ein geeignetes Modell zum Studium der B-Zell-Selektion *in vivo*. Hingegen konnten tolerante, Lysozym-spezifische B-Zellen in den doppelt-transgenen Tieren (MD4 x sHEL) ausschließlich in den follikulären Mantelzonen von Milz, Lymphknoten und Peyerschen Plaques detektiert werden, nicht jedoch in der Marginalzone der Milz (Mason, Jones et al. 1992). Ferner konnten in doppelt-transgenen Tieren (wobei das Antigen in der membran-gebunden Form exprimiert wurde; MD4 x mHEL) keine Lysozym-bindenden B-Lymphozyten (unterschiedlicher Affinität) in den peripheren lymphatischen Organen detektiert werden (Hartley and Goodnow 1994).

Darüber hinaus konnte von Hartley et al. (ebenfalls unter Verwendung der HEL-Ig-transgenen Mäuse) gezeigt werden, dass die Induktion von entweder Anergie oder Deletion nicht von der Antikörperaffinität oder dem Isotyp abhängig ist, sondern vielmehr von der Form des Antigens (löslich oder membrangebunden, monomer oder oligomer). Sie schlussfolgerten daraus, dass das Ausmaß der Rezeptorquervernetzung qualitativ unterschiedliche Auswirkungen auf die Signalweiterleitung für die B-Zell-Entwicklung hat (Hartley, Crosbie et al. 1991).

1.3. Transgene Mäuse als Werkzeug in der Forschung

Tiermodelle werden seit vielen Jahren erfolgreich in der biomedizinischen Forschung eingesetzt. Sie dienen vor allem der Erforschung von Ätiologie und Pathogenese humaner Erkrankungen mit dem Ziel geeignete Therapiestrategien zu entwickeln. So existieren Tiermodelle mittlerweile für fast jede humane Erkrankung. Besonders Mäuse (aber auch Ratten) eignen sich dafür aus mehreren Gründen: abgesehen von ihrer kurzen Reproduktionszeit, haben sie nur mäßige Haltungsansprüche und beanspruchen – verglichen mit anderen Säugern – nur wenig Platz. Darüber hinaus können mithilfe von Tiermodellen die den humanen Erkrankungen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen identifiziert wer-

den [Jirholt et al., 2001]. Die Entwicklung transgener, also genetisch veränderter (manipulierter) Mäuse hat einen wesentlichen Teil dazu beigetragen. Die erste transgene Maus wurde 1974 von Rudolf Jänisch generiert (Jaenisch and Mintz 1974): Er brachte Fremd-DNA in frühe Mausembryonen ein. Die daraus resultierenden Tiere exprimierten das modifizierte Gen in sämtlichen Geweben. In nachfolgenden Experimenten, in denen er mithilfe eines Retrovirus Leukämiegene in frühe Mausembryonen einbrachte, konnte Jänisch zeigen, dass die veränderten Gene nicht nur in die Mäuse selbst, sondern auch in ihre Nachkommenschaft integriert waren (Jaenisch 1975, Jaenisch 1976). Seit dieser ersten Beschreibung wurden unzählige neue Möglichkeiten und Verfahren zur Generierung genetisch veränderter Mäuse entwickelt. Zudem hat sich die Zahl der verfügbaren transgenen Linien seitdem vervielfacht.

All diesen Techniken gemein ist, dass die generierten transgenen Linien zunächst für mindestens 6 bis 8 (optimal für 10) Generationen auf einen Wildtypstamm zurückgekreuzt werden müssen, bevor sie für Experimente genutzt werden können. Bei der Erzeugung transgener Linien werden die im ersten Wurf nach Injektion erhaltenen transgenen Tiere als Chimären (*Founder* oder F0-Tiere) bezeichnet, da sie aus nicht-transgenen Zellen – hervorgegangen aus Zellen der Blastozyste – und transgenen Zellen – entwickelt aus den injizierten, homolog rekombinierten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) – bestehen. Durch Rückkreuzung, d.h. die Verpaarung der Chimären mit Wildtyptieren (vom Stamm des Blastozystenspenders, z.B. C57BL/6), wird die genetische Uniformität der transgenen Tiere erzeugt. Die Notwendigkeit einer Rückkreuzung wird für den Vergleich konventionell transgener mit retrogenen Tieren von Bedeutung sein.

1.4. Die Verwendung retroviraler Vektoren für den (therapeutischen) Gentransfer

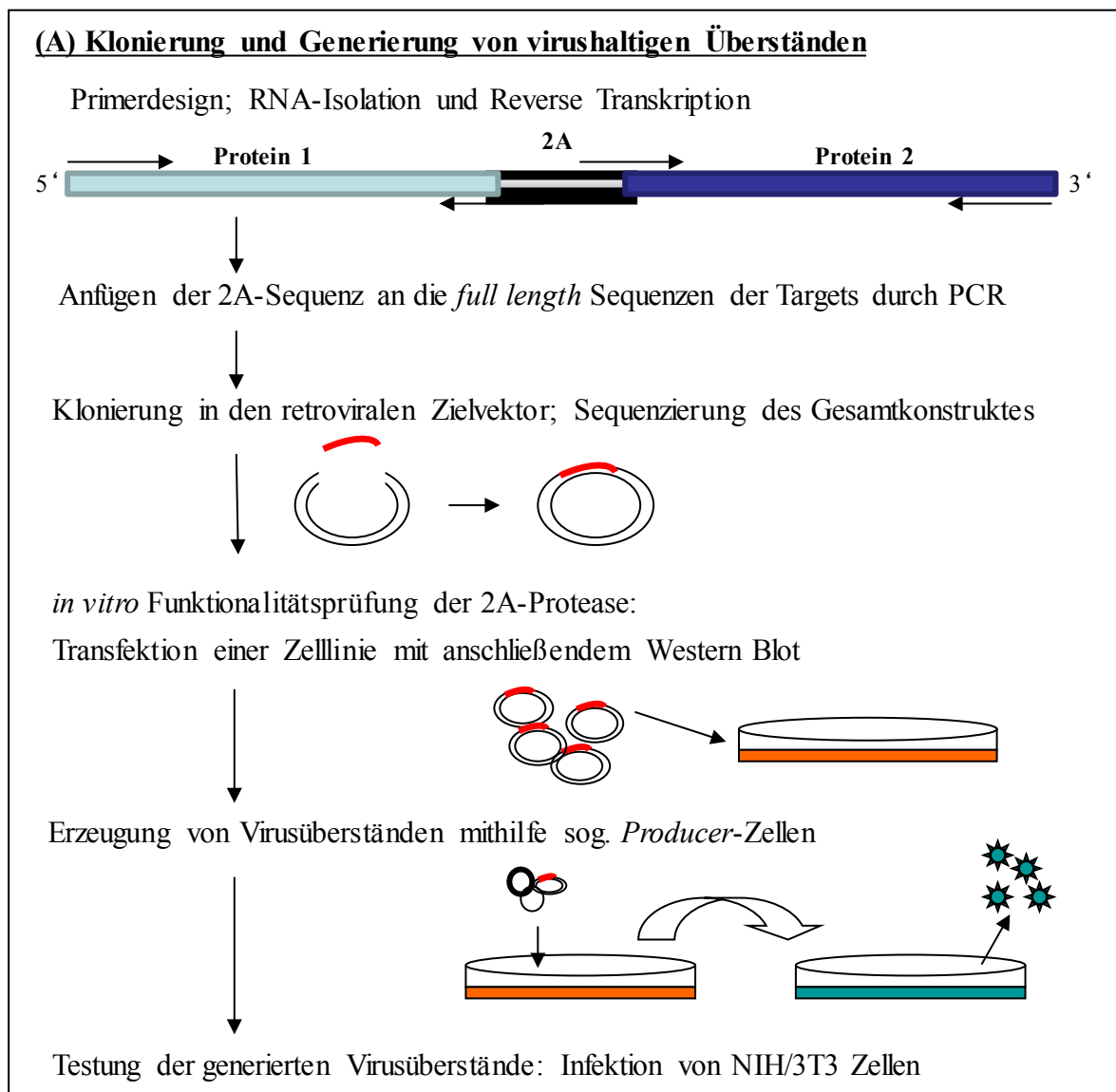
Große Aufmerksamkeit wurde in den vergangenen Jahren der Entwicklung des retroviralen Gentransfers gewidmet. Sie sind ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung sicherer Vektoren zum Gentransfer. Dabei wird sich vor allem zunutze gemacht, dass Retroviren sich in verschiedene Säugerzellen integrieren können und somit den gerichteten Gentransfer ermöglichen (Swift, Lorens et al. 2001). Retrovirale Vektoren eignen sich (besonders) zum Studium des Immunsystems, da sie sowohl das Einbringen als auch die Expression von Zielgenen in Zellen des Immunsystems erlauben. Sie sind einfach zu manipulieren und verfügen über eine stabile, lang andauernde Genexpression, da sie sich in das Wirtsgenom integrieren (Cherry, Biniszkiewicz et al. 2000, Lois, Refaeli et al. 2001, Chang and Sadelain 2007).

Retroviren besitzen das Enzym reverse Transkriptase, das einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umschreibt. Daher stammt auch die Bezeichnung „Retroviren“ (von „retro“ – „rückwärts“). Voraussetzung für die Replikation der Retroviren ist die Integration der aus dem Wirtsgenom gebildeten DNA in das Wirtszellgenom. Die für die Virusreplikation essentiellen Gene sind *tat* (*transactivation transcription*, genereller Transkriptionsaktivator) und *rev* (*regulator of expression of virion proteins*, posttranskriptioneller Aktivator für Synthese viraler Strukturproteine) sowie der LTR-Abschnitt (Promotoren und Enhancer-Elemente). Zu den charakteristischen Strukturgenen zählen *gag* (*group-specific antigen*, gruppenspezifisches Antigen), *pol* (kodiert für virale Enzyme wie Protease, reverse Transkriptase und Integrase) und *env* (*envelope*, Glykoproteine der Hülle). Die Familie der *Retroviridae* umfasst mehrere humanmedizinisch bedeutsame Viren; zur Gattung der Lentiviren gehört dabei das HI-Virus, der Erreger des *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) (Kayser, Bienz et al. 2005). Der Transfer retroviral transduzierter Zellen findet bereits in der Therapie von Tumorerkrankungen klinische Anwendung (Schuster, Busch et al. 2007, Yang, Cohen et al. 2008).

1.5. Retrogene Mäuse

Die Generierung retrogener Mäuse (die Bezeichnung „*retrogen*“ setzt sich zusammen aus „*retro*“ von Retrovirus und „*gen*“ von transgen) wurde erstmalig im Jahr 2006 von der Arbeitsgruppe um Dario A. A. Vignali für diverse T-Zell-Rezeptoren (TZR) beschrieben (Holst, Szymczak-Workman et al. 2006, Holst, Vignali et al. 2006, Bettini, Bettini et al. 2012). Die Verwendung dieses Protokolls ermöglicht die stöchiometrische Expression von Proteinen (zum Beispiel der TZR α - und TZR β -Kette) von einem über ein 2A-Peptid verbundenen multizistronischen retroviralen Vektor durch retroviral-vermittelten Stammzellgentransfer in Mäusen. Der Gebrauch von selbst-spaltenden (*self-cleaving*) 2A-Peptiden ist besonders für experimentelle Ansätze geeignet, die eine stöchiometrische Expression der Zielproteine (zum Beispiel B- und T-Zell Rezeptoren) erfordern. Sie werden anstelle der klassischerweise zur Expression mehrerer Proteine verwendeten IRES (*Internal Ribosome Entry Site*, interne ribosomale Eintrittsstelle) eingesetzt, die durch eine geringere Expression des stromabwärts der IRES befindlichen Proteins charakterisiert sind. Das über ein 2A-Peptid verbundene, rekombinante Konstrukt wird in einen retroviral-basierenden Zielvektor kloniert (**Abb. 3**). In dieser Arbeit wurde ein *Murine Embryonic Stem cell Virus* (MESV; Vektorkarte im Anhang) genutzt, der vom retroviralen *Myeloproliferativen Sarcomavirus* (MPSV) abstammt. Gemeinsam mit den viralen Helferplasmiden (pEnv und

pGagPol) wird das rekombinante retrovirale Plasmid zur Erzeugung von sog. *Producer*-zellen verwendet. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie das gewünschte Molekül als Virus in den Kulturüberstand abgeben. Der virushaltige Überstand dient der Infektion des mit Vorläuferzellen angereicherten Knochenmarks der Spendermäuse (Verhältnis von Spender zu Empfänger 1:1); die transduzierten Knochenmarkszellen werden schließlich zur Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfängertiere verwendet. Die erfolgreiche Rekonstitution kann bereits nach wenigen Wochen aus dem Blut der Tiere überprüft werden. Circa 6 bis 8 Wochen nach Rekonstitution können die retrogenen Mäuse analysiert werden; der jeweilige Analysenzeitpunkt ist dabei abhängig vom Ziel des Experiments bzw. der zu untersuchenden Zellpopulationen (Holst, Vignali et al. 2006). Die wesentlichen Schritte für die Generierung retrogener Mäuse sind in **Abb. 3** schematisch dargestellt.



(B) Retroviral-vermittelter Stammzellgentransfer

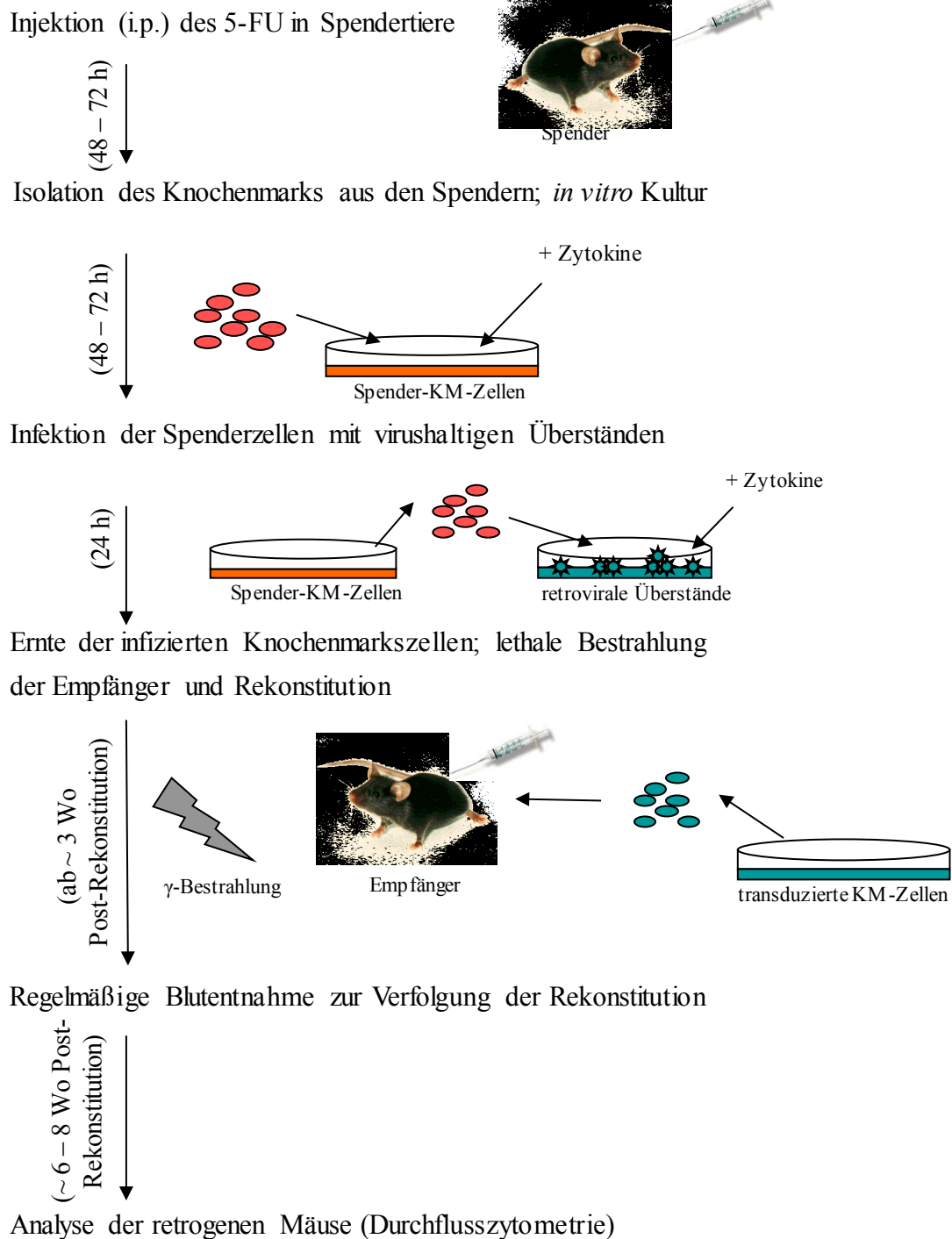


Abb. 3. Experimenteller Ablauf der Generierung retrogener Mäuse. Die experimentelle Durchführung lässt sich in zwei thematische Abschnitte einteilen: (A) Klonierung und *in vitro* Versuche zur Testung der Funktionalität des 2A-Peptids sowie Generierung von virushaltigen Überständen, (B) Generierung und Analyse der retrogenen Mäuse. Die Abbildung basiert auf (Holst, Vignali et al. 2006) und wurde für die Generierung der BZR-retrogenen Mäuse optimiert und modifiziert.

1.5.1. Vor- und Nachteile von retrogenen gegenüber transgenen Mäusen

Vergleicht man die Generierung retrogener mit der konventioneller transgener Mäuse, so fallen mehrere Vorteile auf: (1) Retrogene Mäuse können im Gegensatz zu transgenen auf jedem genetischen Hintergrund generiert werden. (2) Sie erfordert keine Rückkreuzung auf den Wildtypstamm, da es zu keiner Keimbahn-Transduktion (*germline transduction*) kommt und jede generierte retrogene Maus als sog. *Founder* bezeichnet werden kann, was gleichzeitig durch Insertion des Transgens hervorgerufene mögliche Ausrichtungen reduziert. Die Generierung retrogener Mäuse ist daher zeit- und kostensparend. (3) Durch die Verwendung von 2A-Peptiden können mehrere Zielproteine gleichzeitig analysiert werden (beispielsweise die Komponenten des CD3-TZR-Co-Komplexes: CD3 ϵ , γ , δ , ζ). (4) Der Phänotyp retrogener Mäuse ist mit dem transgener Tiere vergleichbar. Dies erlaubt die Gegenüberstellung der mit retrogenen Mäusen erzielten Daten mit den bislang mit konventionellen transgenen Tieren erzielten Daten.

Allerdings hat die Generierung retrogener Mäuse auch Nachteile: (1) Beispielsweise ist die Frequenz, der aus einer Maus erhaltenen retrogenen Zellen geringer als die von transgenen Tieren. (2) Da das Retrogen nicht in die Keimbahn-DNA des Empfängers integriert, lassen sich retrogene Mäuse nicht durch Züchtung vermehren, vielmehr müssen sie durch retroviral vermittelten Stammzellgentransfer in lethal bestrahlte Empfänger neu generiert werden. (3) Schließlich ist die Analyse retrogener Mäuse auf die Zellen des hämatopoietischen Systems beschränkt, da nur diese die Fähigkeit besitzen, sich aus Vorläuferzellen in ausdifferenzierte (reife) Lymphozyten zu entwickeln (Holst, Vignali et al. 2006).

1.5.2. TZR retrogene Mäuse

Neben den diversen von Holst et al. beschriebenen TZR retrogenen Mäusen (gerichtet gegen die Ovalbumin-spezifischen TZRs OTI, OTII etc.) (Holst, Vignali et al. 2006), wurden von Alli et al. Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)-TZR retrogene Mäuse generiert (Alli, Nguyen et al. 2008). Das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein ist Bestandteil der Myelinscheiden des Zentralen Nervensystems (ZNS) und wurde als Autoantigen der Multiplen Sklerose (MS) identifiziert. Ein weithin akzeptiertes Tiermodell zum Studium der MS basiert auf der Immunisierung susceptibler Stämme mit dem Antigen (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, EAE). Die von Alli et al. generierten TZR retrogenen Mäuse exprimierten für das MOG(35-55)-Peptid spezifische TZR unterschiedlicher Affinität, mit dem Ziel die pathogenen Eigenschaften selbst-spezifischer T-Zell-Rezeptoren zu untersuchen. Die MOG(35-55) TZR retrogenen Tiere wurden auf Grundla-

ge des von Holst et al. beschriebenen Protokolls unter Verwendung des T2A-Peptids generiert. Einige Tiere entwickelten eine spontane EAE. Nach aktiver Immunisierung mit dem Antigen zeigten die MOG TZR retrogenen Mäuse eine früher einsetzende und in ihrem Verlauf stärkere EAE als entsprechende Kontrolltiere. Die Arbeitsgruppe konnte somit die Anwendbarkeit des retrogenen Systems zum Vergleich verschiedener MOG-spezifischer TZR in der EAE demonstrieren (Alli, Nguyen et al. 2008).

Szymczak et al. untersuchten mithilfe retrogener Mäuse, die die Komponenten des CD3-T-Zell-Corezeptor-Komplexes exprimierten, die T-Zell-Entwicklung in CD3-defizienten Mäusen (Szymczak, Workman et al. 2004). Dabei verwendeten sie ein einziges multizistronisches, retrovirales Konstrukt, das alle vier Proteine des CD3-Rezeptors (CD3 ϵ , γ , δ , ζ) kodiert. Die einzelnen Zistrons wurden durch unterschiedliche 2A-Peptidsequenzen miteinander verknüpft, um homologe Rekombinationen zu verhindern. Die Rekonstitution von CD3-defizienten Mäusen resultierte in einer wiederhergestellten (normalen) T-Zell-Entwicklung und -Funktion.

1.6. 2A-Peptide

2A-Peptide (oder 2A-Proteasen) findet man natürlicherweise in den *Picornaviridae*, einer Familie kleiner (von lateinisch „*pico*“) einzelsträngiger RNA-Viren, die die humanpathogenen Gattungen der Entero-, Hepato- und der Rhinoviren umfassen. Ihr Genom kann in drei Regionen unterteilt werden: eine lange nicht-kodierende Region, ein einziges großes offenes Leseraster, das für ein Polyprotein von etwa 225 kDa kodiert sowie eine kurze nicht-kodierende Region mit Poly(A)-Schwanz (de Felipe, Martín et al. 1999). Die Virus-RNA kodiert ferner für ein Peptid, VPg (*viral protein genome-linked*), das sich am 5'-Ende befindet; es fehlt jedoch später in den meisten viralen Transkripten. Picornaviren kodieren all ihre Proteine (sowohl Struktur- als auch Funktionsproteine) in Form eines einzigen Polyproteins, das eine Reihe von Prozessierungen durchläuft. Diese Prozessierungen werden von der Virus-kodierenden 2A-Protease vermittelt und liefern schließlich die reifen Virusproteine. Vier von diesen Proteinen bilden das Viruskapsid (VP1-VP4), hingegen sind andere in der Virusreplikation von Bedeutung (Stanway 1990, Lin, Chen et al. 2009). Während der Translation (Polyproteinprozessierung) kommt es zu einem endogenen Spaltereignis am C-Terminus des 2A-Peptids (zwischen G und P). Es verbleibt danach als Anhängsel am C-Terminus des stromaufwärts liegenden Proteins (**Abb. 4**).

Interessanterweise funktioniert die 2A-Sequenz unabhängig vom viralen Polyprotein-Kontext. Dies ermöglicht den Austausch der stromaufwärts und -abwärts gelegenen viralen

Proteinsequenzen durch heterologe Gene (Ryan and Drew 1994) und macht die 2A-Proteasen somit zu einem attraktiven Werkzeug der Biotechnologie und Biomedizin. Weiterhin erlauben sie die gleichzeitige Expression von bis zu vier verschiedenen Proteinen (Szymczak, Workman et al. 2004, de Felipe, Luke et al. 2006). 2A-Proteasen sind noch aus einem weiteren Grund ein geeignetes Werkzeug: Sie garantieren die äquimolare Expression der Zielproteine. Dies macht sie verglichen mit den bislang verwendeten IRES-Elementen überlegen, bei denen die Translation für jedes Zistron separat initiiert wird und infolgedessen die Zielproteine nicht in äquimolaren Mengen vorliegen (Mizuguchi, Xu et al. 2000, de Felipe 2004). Hingegen erfolgt die Initiation der Translation bei Verwendung einer 2A-Sequenz ausschließlich an der ersten Zielsequenz.

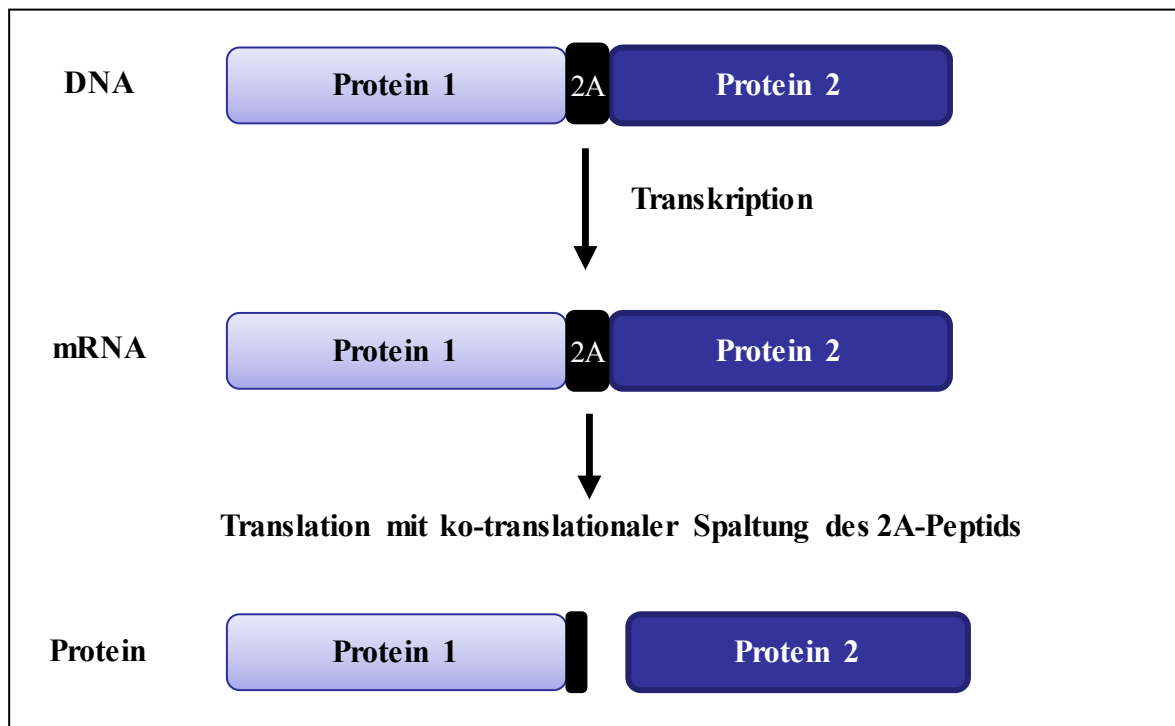


Abb. 4. Verbleib des 2A-Peptids nach ko-translationaler Spaltung am C-Terminus des stromaufwärts gelegenen Proteins. Die für die Zielproteine kodierende DNA wird in mRNA transkribiert. Während der Translation erfolgt die autokatalytische Spaltung des 2A-Peptids zwischen dem C-terminalen Prolin und Glyzin. Ein Großteil des 2A-Peptids verbleibt als Anhängsel mit ~18 aa am C-Terminus des stromaufwärts gelegenen Proteins haften. Eigene Darstellung.

1.6.1. Die gebräuchlichsten 2A-Peptide

Je nach ihrer Herkunft bzw. ihrem Wirtsspektrum sind unterschiedliche 2A-Peptide beschrieben. Die gebräuchlichsten 2A-Sequenzen sind in **Tabelle 1** dargestellt. Wie bereits erwähnt, funktionieren die 2A-Proteasesequenzen auch außerhalb des Picorna-viralen Kontextes und finden daher breite Anwendung in Biomedizin und Biotechnologie. Allerdings spalten nicht alle 2A-Proteasen mit der gleichen Effizienz. Dies sollte bei der Experiment-

planung berücksichtigt werden. Höchste Spaltungseffizienzen (>99%) wurden für das vom *Foot-and-Mouth-Disease Virus* (FMDV)-stammende 2A-Peptid gezeigt (Ryan and Drew 1994, Donnelly, Hughes et al. 2001, Donnelly, Luke et al. 2001).

Tab. 1. Übersicht der meist verwendeten 2A-Peptide. Aus Szymczak A.L. et al. nat biotechnology 2004 und Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS; http://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/03_Antragsteller/06_Institutionen_fuer_biologische_Sicherheit/01_ZKBS/gentechnik_zkbs_node.html). Konservierte Sequenzbereiche sind fett markiert.

Name	Herkunft	Wirt	Sequenz
F2A	<i>Foot-and-Mouth Disease Virus</i> (FMDV) – Maul- und Klauenseuchevirus (<i>Picornaviridae</i>)	Paarhufer (v.a. Rinder)	V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P
E2A	<i>Equine Rhinitis A Virus</i> (ERAV) – Equines Rhinitis A-Virus (<i>Picornaviridae</i>)	vorwiegend Pferde, auch Kaninchen, Affen, Menschen	Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P
P2A	<i>Porcine Teschovirus-1</i> (PTV) – Porcines Teschovirus 1 (<i>Picornaviridae</i>)	(Haus- und Wild-)Schweine	A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P
T2A	<i>Thosea asigna Virus</i> (TaV) (<i>Tetraviridae</i>)	Schmetterlinge der Familie <i>Limacodidae</i>	E G R G S L L T C G D V E E N P G P

1.6.2. Die Verwendung von 2A-Peptiden

Eine weitere interessante und vielversprechende praktische Anwendung des 2A-Peptides wurde von Fang et al. beschrieben (Fang, Qian et al. 2005). Vor dem Hintergrund der therapeutischen Anwendung monoklonaler Antikörper zur Therapie von Krebs und anderen Erkrankungen exprimierten sie einen monoklonalen Antikörper spezifisch für den *vascular endothelial cell growth factor receptor-2* (VEGFR2; DC101) von einem einzigen offenen Leseraster (*open reading frame*, ORF), indem sie die leichten und schweren Ig-Ketten durch eine 2A-Peptid-Sequenz miteinander verbunden und in einen adenoviralen Vektor kloniert. Eine einzige Injektion des auf diese Weise generierten adenoviralen Plasmids resultierte in niedrigen VEGFR2-Serumkonzentrationen über einen längeren Zeitraum in Tumormäusen. Mithilfe dieses Expressionssystems konnten sie zum ersten Mal die Bildung funktioneller Antikörper *in vivo* demonstrieren. Weiterhin konnten Fang et al. die anti-Tumorstoffwirkung in zwei verschiedenen Tumormodellen zeigen. In einer späteren Arbeit veröffentlichten dieselben Autoren eine verbesserte Variante des Expressionssystems, bei dem die Antikörperexpression durch die *in vivo* Injektion von Rapamycin induziert wird (Fang, Yi et al. 2007). Es sei an dieser Stelle noch einmal auf die Verwendung eines adenoviralen anstelle eines retroviralen Plasmids (wie es im retrogenen System verwendet wird) aufmerksam gemacht.

1.7. Retrovirale Verpackungssysteme

Retrovirale Verpackungssysteme werden seit mehreren Jahrzehnten als leistungsfähiges Werkzeug für den Gentransfer verwendet. Aufgrund ihrer einfachen, schnellen und sicheren Handhabung finden sie mittlerweile eine immer breitere Anwendung (Miller 1990). Verpackungszellen (*packaging cells*) stellen sowohl strukturelle als auch regulatorische Proteine, die für den in *trans* Zusammenbau infektiöser viraler Partikel erforderlich sind, zur Verfügung. Das RNA-Genom wird über eine transiente Transfektion und die nachfolgende Transkription des retroviralen Plasmids in die Zielzellen eingeführt. Da retrovirale Vektoren ausschließlich die für Verpackung, reverse Transkription und Integration erforderlichen *cis*-Elemente tragen, ist der Retrovektor nach seiner Transduktion nicht mehr vermehrungsfähig. Darüber hinaus integriert der Retrovirus als sog. Provirus in das Zielgenom. Dies ist von Vorteil, da der Vektor dadurch beginnend vom 5' *long terminal repeat* (LTR) transkribiert und ein Polyadenylierungssignal im 3'LTR verwendet.

Die Phoenix-Zellen wurden durch Modifizierung aus HEK293T-Zellen im Labor von Garry P. Nolan generiert, wobei zwei verschiedene, nicht-retrovirale Promotoren (*gag-pol* und *env*) sowie zwei Selektionsmarker eingebaut wurden (Swift, Lorens et al. 2001). Diese Modifizierung der Zellen erlaubt die schnelle Generierung retroviraler Partikel, die für die Infektion von sich teilenden Zellen verwendet werden können. Mithilfe der beiden Selektionsmarker Hygromycin und Diphtheriatoxin können die Phoenix-Zellen regelmäßig auf die Expression der Verpackungsfunktionen (*gag-pol*) selektioniert werden. Man unterscheidet zwischen ecotrophen und amphotrophen Verpackungssystemen. Ecotrophe Systeme können ausschließlich in murine Zielzellen integrieren, wohingegen amphotrophe Gene in sämtliche Säugerspezies transferieren können [<http://www.stanford.edu/group/nolan/index.html>].

1.8. Das Modell der G6PI-induzierten Arthritis

Das Tiermodell der Glucose-6-Phosphat-Isomerase-induzierten Arthritis (G6PI-induzierten Arthritis) dient der Erforschung der humanen Autoimmunerkrankung Rheumatoide Arthritis (RA), einer chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankung, von der circa ein Prozent der westlichen Bevölkerung betroffen ist und deren Ätiologie und Pathogenese nur unvollständig verstanden sind. Eine unbehandelte Rheumatoide Arthritis verursacht die Zerstörung der betroffenen Gelenke und führt daher zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität und unter Umständen neben den lokalen Schäden auch zu systemischen Erscheinungen (wie kardiovaskuläre oder pulmonale Erkrankungen). Die genetische Asso-

ziation mit dem HLA-DRB1 Locus ist seit langem bekannt (Scott, Wolfe et al. 2010, McInnes and Schett 2011). Hingegen ist das Autoantigen der RA – obwohl Gegenstand intensiver Forschung – noch nicht identifiziert (McInnes and Schett 2011). Zunächst wurden gelenkspezifische Autoantigene, wie beispielsweise das Kollagen Typ II, diskutiert. Mithilfe von Mausmodellen erzielte Ergebnisse, lassen hingegen systemisch exprimierte Autoantigene vermuten, wie die G6PI im K/BxN-Modell (Kouskoff, Korganow et al. 1996, Asquith, Miller et al. 2009). Dieses transgene Modell mit spontaner Arthritis-Induktion resultiert aus einer TZR-transgenen Maus-Linie (KRN/C57BL/6 TZR tg), die mit dem *non obese diabetes*-Stamm (NOD-Stamm) gekreuzt wurde. G6PI wurde in diesem Modell als systemisches Antigen identifiziert. Somit ergibt sich als zugrunde liegendes pathogenetisches Prinzip, dass ein ubiquitär exprimiertes Antigen eine lokale Gelenkerkrankung verursacht (Korganow, Ji et al. 1999, Ji, Ohmura et al. 2002, Kamradt and Schubert 2005). Das G6PI-induzierte Arthritis-Modell wurde daher entwickelt, um unter anderem das Vermögen der G6PI-spezifischen Immunantwort für die humane Erkrankung zu evaluieren.

Im G6PI-induzierten Arthritismodell führt eine einzige subkutane Immunisierung in den nicht-transgenen, suszeptiblen Stämmen DBA/1 und SJL mit G6PI in komplettem Freund-schen Adjuvans (*complete Freund's adjuvant*, CFA) zu einer symmetrischen Polyarthrit. Die Schwellung der peripheren Gelenke der Tiere beginnt an Tag 9 nach Immunisierung und erreicht ihr Maximum an Tag 15 nach Immunisierung (siehe **Abb. 5**); anschließend geht die Gelenkschwellung zurück, die durch die Entzündung verursachten Knochen- und Knorpelzerstörungen sind jedoch irreversibel (Schubert, Maier et al. 2004).

Aus in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten wissen wir, dass in diesem Modell der Arthritis sowohl T- als auch B-Zellen für die Entstehung der Erkrankung unerlässlich sind und dass B-Lymphozyten selbst notwendig, aber nicht ausreichend zur Arthritisinduktion sind (Schubert, Maier et al. 2004, Bockermann, Schubert et al. 2005, Frey, Bruns et al. 2011).

Bis zum heutigen Tag existieren weder G6PI-spezifische BZR- noch TZR-transgene Linien auf dem Hintergrund der suszeptiblen Stämme DBA/1 und SJL. Daher waren wir an der Generierung BZR-retrogener Mäuse interessiert, um gezielt die Rolle Antigen-spezifischer B-Lymphozyten in diesem Mausmodell untersuchen zu können.

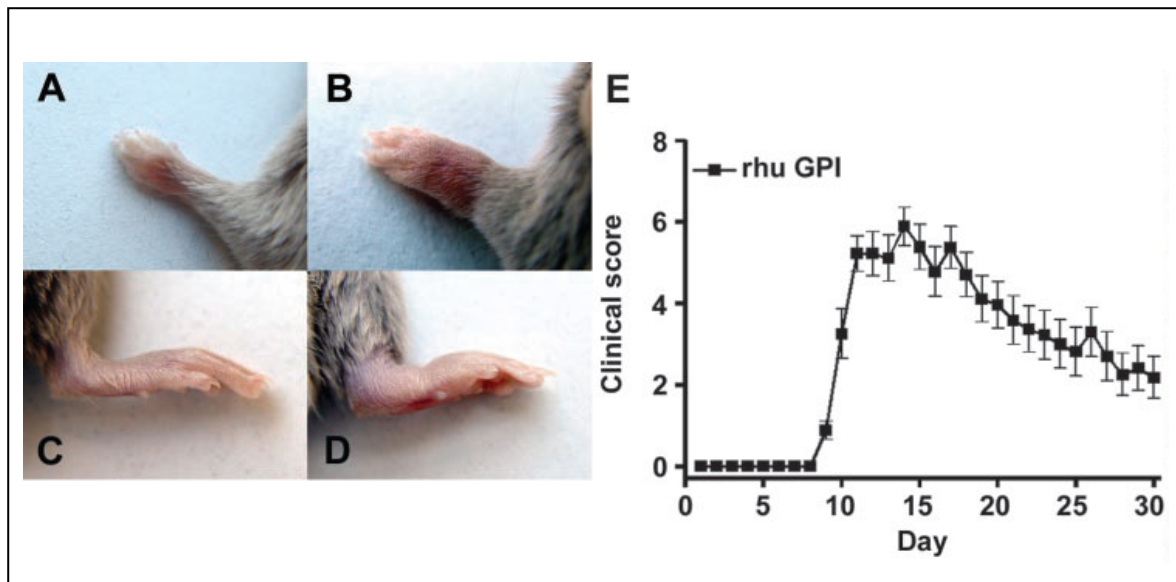


Abb. 5. Klinischer Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis. DBA/1-Mäuse wurden mit G6PI in CFA immunisiert und die Arthritis über die ersten 30 Tage makroskopisch begutachtet. In (B) und (D) sind die Vorder- und Hinterbeine einer G6PI-immunisierten und in (A) und (C) einer Kontroll-Maus gezeigt. (E) Klinischer Score (SEM) nach Immunisierung mit rhu G6PI (Schubert, Maier et al. 2004).

1.9. Zielstellung

Aus eigenen Vorarbeiten im Modell der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (G6PI) induzierten Arthritis wissen wir, dass sowohl T- als auch B-Lymphozyten für die Induktion und Pathogenese der Erkrankung unerlässlich sind. Um im Speziellen die Rolle Antigen-spezifischer B-Zellen in diesem Modell zu untersuchen, sollten in der vorliegenden Arbeit retrogene Mäuse („*retro*“ von Retrovirus und „*gen*“ von transgen) generiert werden, die G6PI-spezifische B-Zellrezeptoren (BZR) exprimieren. Weiterhin sollte mithilfe dieser G6PI-BZR retrogenen Mäuse herausgefunden werden, in welcher Funktion die B-Lymphozyten zur Arthritispathogenese beitragen: ob als professionelle Antigen-präsentierende Zellen, durch die Produktion von G6PI-spezifischen Antikörpern, oder durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen.

Die Generierung retrogener Mäuse erschien dafür als geeignetes Mittel der Wahl, da auf den für die G6PI-induzierte Arthritis suszeptiblen Hintergründen DBA/1 und SJL keine transgenen Linien existieren und retrogene Mäuse auf jedem genetischen Hintergrund generiert werden können. Dabei können zwei oder mehr Proteine von einem einzigen 2A-Peptidverbundenen, multizistronischen retroviralen Vektor durch retroviral-vermittelten Stammzellgentransfer in Mäusen exprimiert werden. Die Verwendung einer selbst-spaltenden 2A-Proteasesequenz garantiert die stöchiometrische Expression des Zielmoleküls, welche bei koexprimierten Proteinen von besonderem Interesse ist.

Als Modellantigen für die erstmalige Generierung BZR retrogener Mäuse haben wir uns für den bereits beschriebenen Lysozym-spezifischen (HEL – *Hen Egg Lysozyme*) BZR MD4 entschieden. Eine MD4 transgene Linie wurde in den 1980er Jahren generiert und intensiv für die Erforschung der Toleranzmechanismen in B-Lymphozyten analysiert.

Zur Evaluierung der Möglichkeiten, die der retrovirale Gentransfer bietet, ist der direkte Vergleich zwischen HEL-transgenen und HEL-retrogenen Mäusen eine notwendige Voraussetzung.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

In den folgenden Auflistungen sind nur verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien angegeben, die nicht zur Standardausstattung eines Labors gehören.

2.1. Biologisches Material

2.1.1. Mäuse

Die Mäuse wurden, soweit nicht anders angegeben, unter spezifiziert pathogen-freien (SPF) Bedingungen vom Institut für Versuchstierkunde (Forschungszentrum Beutenberg, Tierhaus 5 sowie Tierhaus Nonnenplan) in Jena gezüchtet. Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Mausstämme verwendet:

C57BL/6	Wildtypstamm
C57BL/6-MD4	exprimieren HEL-spezifisches IgM und IgD
C57BL/6-OTII	exprimieren Ovalbumin-spezifischen TZR (Peptid 323-339)
<i>Rag</i> ^{-/-}	besitzen keine reifen B- und T-Lymphozyten

Die transgene Linie MD4 wurde freundlicherweise von Richard J. Cornall (University of Oxford, GB) zur Verfügung gestellt und heterozygot mit C57BL/6 wt verpaart. Alle Tierversuche wurden vom Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt (Reg.-Nr. 02-038/06).

2.1.2. Bakterienstämme

<i>E.coli</i> DH5α	Klonierungsstamm
--------------------	------------------

2.1.3. Zelllinien

Die nachfolgende Tabelle enthält alle verwendeten Zelllinien sowie Informationen zu Kulturmedium und Wachstum der jeweiligen Linie (**Tab. 2**).

Tab. 2. Verwendete Zelllinien und ihre Wachstumsbedingungen.

Zelllinie	Zelltyp	Kulturmedium	Wachstum
CHO-K1	<i>Chinese hamster ovary</i> ; Epithelzellen; Subklon der CHO-Zelllinie (Puck, Cieciura et al. 1958)	cRPMI-1640	adhärent
HyHEL-10	Hybridom, das hoch-affine Lysozym-spezifische AK produziert, auf BALB/c-Hintergrund (IgH ^a) (Smith-Gill, Lavoie et al. 1984, Smith-Gill, Mainhart et al. 1984)	cRPMI-1640	Suspension
NIH/3T3	murine Fibroblastenzelllinie (Jainchill,	cDMEM*	adhärent

	Aaronson et al. 1969)		
PhoenixEco	Durch Einbringen von <i>gag-pol</i> und ecotropen <i>env</i> von MoMLV (auf zwei verschiedenen Plasmiden) aus HEK 293T generiert (Swift, Lorens et al. 2001)***	cDMEM	adhärent
R5B	Pro-B-Zelllinie (<i>rag2</i> ^{-/-}), IL-7-abhängig (Corfe, Gray et al. 2007, Milne, Corfe et al. 2008)	Optimem + Supplemente**	Suspension
WEHI231	B-Zell-Lymphom-Linie aus BALB/c x NZB (Boyd and Schrader 1981)	cRPMI-1640*	Suspension
X63Ag-653 BPV-IL-3	Mausmyelom-Zelllinie, sezerniert mIL-3 (Haan, Hermanns et al. 2000)	IMDM + 5% FCS + 2% Glutamax + 1% Penicillin / Streptomycin	Suspension

* cRPMI-1640 bzw. cDMEM: RPMI-1640 (+ L-Glutamin) bzw. DMEM (4,5 g Glucose, + L-Glutamin; beide PAA Laboratories/GE Healthcare, Freiburg) supplementiert mit 10% FCS, 100mM Hepes, 20U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 50µM 2-Mercaptoethanol

** Supplemente: 10% FCS, 100mM Hepes, 20U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 50µM 2-Mercaptoethanol, 3% IL-7-Überstand, L-Glutamin, Na-Pyruvat

*** <http://apps2.bvl.bund.de/cellswwww/protected/main/cell.do?method=detail&theId=167&d-49653-p=null>

2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2.2.1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden allgemeine Laborchemikalien von SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen), ROTH (Karlsruhe), APPLICHEM (Darmstadt) bzw. SERVA (Heidelberg) bezogen. Gebrauchslösungen wurden mit voll entsalztem Wasser aus einer „Milli-Qplus“ Filteranlage (MILLIPORE, Schwalbach) angesetzt und bei Bedarf autoklaviert.

5-Fluorouracil (5'-FU)	Universitätsklinikum Jena
Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control (FBS) Compensation Particles Set	BD BIOSCIENCES, Heidelberg
Anti-Rat Ig, κ/Negative Control (FBS) Compensation Particles Set	BD BIOSCIENCES, Heidelberg
CD90-MicroBeads, mouse	MILTENYI BIOTEC, Bergisch-Gladbach
Cotrim k (Sulfamethoxazol und Trimethoprim)	RATIOPHARM GMBH, Ulm
dNTP Mix (PCR-Nukleotide)	GENECRAFT, Köln
Geneticin (G418-Sulfate)	LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt
Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz	LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt
muriner Flt3-L	MILTENYI BIOTEC, Bergisch-Gladbach
OptiMEM	LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt
Polybren	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
rekombinantes murines IL-6	MILTENYI BIOTEC, Bergisch-Gladbach
rekombinantes murines IL-7	MILTENYI BIOTEC, Bergisch-Gladbach

rekombinantes SCF	MILTENYI BIOTEC, Bergisch-Gladbach
RetroNectin®	TAKARA BIO EUROPE, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
<i>RNasin</i> ® RNase-Inhibitor	PROMEGA, Mannheim
Trypsin/EDTA	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen

2.2.2. Enzyme

<i>DreamTaq Green</i> DNA Polymerase	FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC, Schwerte
<i>Expand High Fidelity</i> PCR System	ROCHE APPLIED SCIENCE, Penzberg
Restriktionsendonukleasen	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main
Reverse Transkriptase M-MuLV	AMERSHAMBIOSCIENCES/GE HEALTHCARE, Freiburg
T4 DNA Ligase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main

2.2.3. Kits

BCA™-Protein <i>Assay Kit</i>	PIERCE, Rockford, USA
<i>ECL Plus Western Blotting Detection Kit</i>	AMERSHAMBIOSCIENCES/GE HEALTHCARE, Freiburg
<i>GeneRacer</i> ® <i>Kit</i>	LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt
<i>High Pure RNA Isolation Kit</i> (Gesamt-RNA)	ROCHE APPLIED SCIENCE, Penzberg
LIVE/DEAD® <i>Fixable Dead Cell Stain Kit</i>	LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt
<i>Pure Yield Plasmid MaxiPrep System</i>	PROMEGA, Mannheim
TOPO TA <i>Cloning</i> ® <i>Kit</i>	LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt
<i>Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System</i>	PROMEGA, Mannheim
<i>Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System Kit</i>	PROMEGA, Mannheim
<i>Zyppy Gel DNA Extractor Kit</i>	ZYMO RESEARCH, Freiburg

2.2.4. Verbrauchsmaterialien

70 µM-Zellsieb	BD BIOSCIENCES, Heidelberg
AutoMACS®-Separationssäulen	MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach
Cluster Tubes	CORNING/COSTAR, Bodenheim
Combitips	EPPENDORF, Hamburg
Cryo 1°C Freezing Container	NALGENE, Rochester, USA
EDTA Röhrchen	SARSTEDT, Nümbrecht
Einmalpipetten in verschiedenen Größen	GREINER, Frickenhausen
Einmalspitzen	GREINER, Frickenhausen

Einmalspritzen und -kanülen	B. BRAUN, Melsungen
Falcon-Röhrchen (15 ml / 50 ml)	GREINER, Frickenhausen
Handschuhe	KIMBERLY CLARK, Koblenz
Immobilon-P (PVDF-Membran; 0,45µM)	MILLIPORE, Schwalbach
KODAK Scientific Imaging Film X-OMAT UV plus	PMA BODE, Berlin
Kryo-Röhrchen	GREINER, Frickenhausen
MACS®-Preseparationsfilter	MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach
Mikro-Quarzküvetten	BIOMETRA, Göttingen
Rad Disk Rodent Microisolation Irradiator Cage	BRAINTREE SCIENTIFIC, Braintree, USA
Reaktionsgefäße	EPPENDORF, Hamburg
Schalen für Bakterienplatten	GREINER, Frickenhausen
Sterilfilter 0,2µm	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Whatman-Filterpapier	BIO-RAD, Dreieich
Zellkulturschalen, -flaschen, -platten	GREINER, Frickenhausen

2.3. Geräte

AutoMACS® (Separator)	MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach
Biometra T3 Thermocycler	BIOMETRA, Göttingen
Bio-Rad Elektrophoresekammer	BIO-RAD, Dreieich
Durchflusszytometer LSR II	BD BIOSCIENCES, Heidelberg
Feinwaage	SARTORIUS, Hannover
<i>Gammacell®40 Exactor</i>	MDS NORDION, Ottawa, Kanada
Geldokumentation „Bio Doc Analyze“	BIOMETRA, Göttingen
Heizblock Thermomixer compact	EPPENDORF, Hamburg
Impfkäfig	FSU, Jena
Inkubatoren	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Schwerte
Lichtmikroskop Axiovert25	ZEISS, Jena
Magnetrührer SB 162-3	STUART BIBBY, Staffordshire, GB
Megafuge 1.0R	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Schwerte
MilliQ Wasseranlage	MERCK MILLIPORE, Darmstadt
Multipipette	EPPENDORF, Hamburg
Neubauer Zählkammer	FEIN-OPTIK, Bad Blankenburg
pH-Meter Knick	PORTAMESS, Berlin
Photometer WPA <i>biowave</i>	BIOCHROM, Cambridge, GB

Präparationsbesteck	AESKULAP, Tuttlingen
Schüttler	HEIDOLPH, Kelheim
SDS-PAGE Elektrophoreskammer Mini-Protean3	BIO-RAD, München
Sterilbank HERAsafe	THERMO FISHER SCIENTIFIC, Schwerte
Stromversorgungsgerät PowerPac Basic	BIO-RAD, Dreieich
UV Tisch „ <i>Transilluminator TI 2</i> “	BIOMETRA, Göttingen
Vortexer Mixer	STUART BIBBY, Staffordshire, GB
Whatman Fastblot B43	BIOMETRA, Göttingen
Zellsortierer FACSAria	BD BIOSCIENCES, Heidelberg

2.4. Software

BD FACSDiva™ 6.0	http://www.bdbiosciences.com/
FlowJo Version 9.6.4	http://www.flowjo.com/
Geneious Pro™ 5.3	http://www.geneious.com/

2.5. Oligonukleotide

In **Tabelle 3** sind die Bezeichnungen und 5' → 3'-Sequenzen der in dieser Arbeit zur Genotypisierung, Klonierung bzw. Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Bei sog. Ankerprimern für die Klonierung, die nur partiell mit der Matrize hybridisieren (ca. 20 Nukleotide) und die ebenfalls Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen beinhalten, sind diese Schnittstellensequenzen unterstrichen. Stromaufwärts davon (5') befinden sich zusätzliche, ebenfalls nicht hybridisierende Nukleotide, die nach „*Cleavage Close to the End of DNA Fragments*“ (NEB-Homepage) vor die entsprechende Schnittstelle einer Restriktionsendonuclease eingefügt wurden, um die Aktivität des Restriktionsenzym zu steigern. Zur Amplifizierung der variablen Regionen der HEL-spezifischen leichten und schweren Immunglobulinketten in der 5' und 3'RACE, wurden degenerierte Primer synthetisiert (Code – komplementär: Y – R (C und T), R – Y (A und G), W – W (A und T), K – M (T und G), M – K (C und A)). Nachfolgende Tabelle zeigt die verwendeten degenerierten sowie ihre komplementären Nukleotide.

Tab. 3. Zur Genotypisierung, Klonierung und Sequenzierung verwendete Primer. Vorwärtsprimer (5') sind mit „forw“, Reverseprimer (3') mit „rev“ gekennzeichnet; alle Sequenzen sind in 5' → 3' Orientierung angegeben. Die Schmelztemperatur ist jeweils nur für den bindenden Bereich berechnet. Bei den Ankerprimern für das rekombinante Konstrukt sind Sequenzbereiche für Restriktionsschnittstellen unterstrichen, Furin-FMDV-2A-Sequenzen kursiv und die αHEL-Sequenzen fett markiert.

Name	Beschreibung	Verwendung	Sequenz (5' → 3')	nt	T _m
------	--------------	------------	-------------------	----	----------------

MATERIALIEN UND METHODEN

SH_59	forw_wt allel (Jax oIMR0015 Tcrd)	Genotypisierung (interner Standard)	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG	20	58°C
SH_60	rev_wt allel (Jax oIMR0016 Tcrd)		GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT	20	60°C
JF_20	forw_IgH MD4	Genotypisierung (MD4)	GCG ACT CCA TCA CCA GCG AT	20	64°C
JF_21	rev_IgH MD4		ACC ACA GAC CAG CAG GCA GA	20	64°C
JF_30	forw_IgV _k 23 HyHEL degeneriert	3'RACE Igκ	GAY ATT GTG MTR ACT CAG TCT C	22	63°C
JF_31	rev_IgV _k 23 HyHEL degeneriert	5'ACE Igκ	GTA TCA ACA GTG TGG ARM CTG	21	62°C
JF_32	forw_IgV _H 10 HyHEL degeneriert	3'RACE Igμ	GAK GTR CAG CTY CAG GAG TCA	21	65°C
JF_33	rev_IgV _H 10 HyHEL degeneriert	5'RACE Igμ	GCA CAG TAG TAW GTG GCT GTG	21	64°C
JF_34	forw_neu_IgV _k 23 HyHEL	3'RACE Igκ	AGT CTC CAG CCA CCC TGT CTG	21	68°C
JF_35	rev_neu_IgV _k 23 HyHEL	5' RACE Igκ	CCA CAC TGT TGA TAC TGA GAG TG	23	68°C
JF_36	rev_neu_IgV _H 10 HyHEL	5'RACE Igμ	TAG TAC TGA TTC TTG GAT GTG TC	23	64°C
JF_37	rev_nested_IgV _H 10	5' <i>Nested</i> RACE Igμ	GTA GCT TAC GTA CCC CAT GTA	21	62°C
JF_38	IgV _H 10 HyHEL	Sequenzierung	CAC TCC AAA ACC GAT CAC AGT AT	23	66°C
JF_42	forw_Igμ CH3/4 domain	Screen der Trans- formanten	GTG TAC CTG CTG CCA CCA GC	20	66°C
JF_44	rev_Igμ _{mem}		GGT GAC GGT GGT GCT GTA GAA	21	66°C
JF_45	rev_neu_nested IgV _k 23	5' <i>Nested</i> RACE Igκ	GAA GCC GTG GAG ACT CAT GTG	21	66°C
JF_46	rev_neu_IgV _k 23	5'RACE Igκ	CGA ACG TGT ACG GCC AGC TG	20	66°C
JF_48	forw_Start αHEL Igκ	FL Klonierung Igκ	AAG CTC GAA GAT GGT TTT CAC AC	23	66°C
JF_49	rev_Ende αHEL Igκ		CTT TGT CTC TAA CAC TCA TTC CT	23	64°C
JF_50	forw_Start αHEL Igμ	FL Klonierung Igμ	GTA GCC TAA AAG ATG ATG GTG	21	60°C
JF_51	rev_Ende αHEL Igμ _{mem}		CTG AGA GTC ATT TCA CCT TGA	21	60°C
JF_55	FL αHEL Igμ _{mem}	Sequenzierung	CGT CCC ACC ACG GGA TGG C	19	74°C
JF_66	forw_AgeI-Kozak-Start αHEL Igμ _{mem}	αHEL Igμ _{mem} – Furin – F2A	<i>GGG ACC GGT GCC GCC</i> <i>ACC ATG ATG GTG TTA</i> <i>AGT CTT CTG TAC</i>	24	66°C
JF_67*	rev_HindIII-F2A-Furin- αHEL Igμ _{mem}		<i>GCC GGC AAG CTT CAG</i> <i>CAG GTC GAA GTT CAG</i>	22	66°C

			<i>GGT CTG CTT CAC GGG GGC CCG CCG CCG CCG TTT CAC CTT GAA CAG GGT GAC G</i>		
JF_68*	forw_ <u>HindIII</u> -F2A-Start αHEL Igκ	F2A – αHEL Igκ	<i>CTG CTG AAG CTT GCC GGC GAC GTG GAG AGC AAC CCC GGC CCC ATG GTT TTC ACA CCT CAG ATA CTT</i>	24	66°C
JF_69	rev_ αHEL Igκ - Stopp – <u>SacII</u>		<i>TCC CCG CGG GGA CTA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GCT</i>	24	66°C
JF_72	αHEL Igμ _{mem}	Sequenzierung	<i>GTC ATC CAG GGT ATC AGA ACC</i>	21	64°C
JF_73	forw_αHEL 3' Igμ _{mem} Ende	Screen rekomb. αHEL-Konstrukt	<i>GC TTT GAG AAC CTG TGG ACC A</i>	21	64°C
JF_74	rev_αHEL 5' Igκ Ende		<i>GAG AAG CCT TGG AGA CTC ATG</i>	21	64°C
JF_75a	forw_R1330	Sequenzierung	<i>CTA CTT AGT CCA GCA CGA AG</i>	20	60°C
JF_76	rev_R1330	Sequenzierung	<i>GGC CTT ATT CCA AGC GGC TT</i>	20	62°C

* Oligos wurden HPLC-aufgereinigt

Alle in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide (10 nmol) wurden von der Firma BioTeZ Berlin Buch GmbH synthetisiert und entweder mittels Gelfiltration oder HPLC gereinigt. Die Primer wurden zu je 50 μM in sterilem destilliertem Wasser gelöst.

2.6. Plasmide

Folgende Plasmide wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

pCR®II-TOPO®	Klonierungsvektor mit 3'T-Überhängen zur direkten Ligation von Taq-amplifizierten PCR-Produkten, <i>amp^r</i> , <i>kan^r</i> , 4 kb (TOPO® TA Cloning® Kit, LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt)
pCR®4-TOPO	Klonierungsvektor mit 3'T-Überhängen zur direkten Ligation von Taq-amplifizierten PCR-Produkten, <i>amp^r</i> , <i>kan^r</i> , 4 kb (GeneRacer® Kit, LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt)
pRMYs-iGFP (pR1330 Ø)	retrovirales Zielplasmid, RSV-MSV – IRES – EGFP, <i>amp^r</i> , ~6,4 kb
pEnv (#522)	Mo-env – ECMV-IRES – pac, ~9,8 kb
pGagPol (R690)	SV40-gagpol, <i>amp^r</i> , ~10,3 kb

2.7. Antikörper und Proteine

2.7.1. Antikörper für die Durchflusszytometrie

Alle verwendeten Antikörper erkennen Maus-Antigene. Die Antikörper waren mit R-Phycoerythrin (PE), Biotin (Bio), Indodicarbocyan (Cy), Alexa-Farbstoffen (A), Allophycocyanin (APC), Perdinin-Chlorophyll (PerCP) oder Tandemkonjugaten dieser Fluorochrome markiert. Antikörper, bei denen als Bezugsquelle „Immunologie Jena“ angegeben ist, wurden am Institut für Immunologie in Jena aus Kulturüberständen der entsprechenden Hybridome aufgereinigt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (**Tab. 4**).

Tab. 4. Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugat	Herkunft	Verwendung
CD16/32	2.4G2/75	Ratte, IgG2b, κ	–	IMMUNOLOGIE JENA	Blockierung unspezifischer Bindungen
B220/CD45R	RA3-6B2	Ratte, IgG2a, κ	PE-Cy7	BIOLEGEND	Oberflächenfärbung
CD19	1D3	Ratte, IgG2a, κ	APC	BD BIOSCIENCES	Oberflächenfärbung
CD19	1D3	Ratte, IgG2a, κ	A430	BD BIOSCIENCES	Oberflächenfärbung
CD19	MB19-1	Maus, IgA, κ	Biotin	eBIOSCIENCE	Oberflächenfärbung
Igκ (κ chain specific)	*	*	PE	SOUTHERN BIOTECH/BIOZOL	Oberflächenfärbung
IgM (μ chain specific)	**	**	Cy5	SOUTHERN BIOTECH/BIOZOL	Oberflächenfärbung
IgM ^a	DS-1	Maus, IgG1, κ	FITC	BD BIOSCIENCES	Oberflächenfärbung
IgM ^a	DS-1	Maus, IgG1, κ	Biotin	BD BIOSCIENCES	Oberflächen-/intrazelluläre Färbung
IgM ^b	AF 6-78	Maus, IgG1, κ	PE	BD BIOSCIENCES	Oberflächen-/intrazelluläre Färbung
MHCII	M5/114.15.2	Ratte, IgG2b, κ	Pacific Blue	BIOLEGEND	Oberflächenfärbung
CD3ε	145-2C11	Arm. Hamster, IgG	PE	eBIOSCIENCE	Oberflächenfärbung
CD4	GK1.5	Ratte, IgG 2b	Pacific Blue		Oberflächenfärbung
CD8α	53-6.7	Ratte, IgG2a, κ	PerCP	BD PHARMINGEN	Oberflächenfärbung
Gr-1	RB6-8C5	Ratte, IgG2b	APC	BD PHARMINGEN	Oberflächenfärbung
CD11c	N418	Arm. Hams-	PE	eBIOSCIENCE	Oberflächen-

		ter, IgG			färbung
TZR V α 2	B20.1	Ratte, IgG2a	PE	eBIOSCIENCE	Oberflächenfärbung
TZR V β 5.1/5.2	MR9-4	Maus IgG1, κ	APC	BD PHARMINGEN	Oberflächenfärbung
SA – APC e-Fluor780	–	–	APC eFluor780	eBIOSCIENCE	Sekundärantikörper
SA – PerCP-Cy5.5	–	–	PerCP-Cy5.5	eBIOSCIENCE	Sekundärantikörper

* gepoolte Antiseren aus mit Maus-Ig κ -Paraproteinen immunisierten Ziegen

** gepoolte Antiseren aus mit Maus-IgM-Paraproteinen immunisierten Ziegen

2.7.2. Primärantikörper für Immunoblots

Ziege anti-Maus Ig κ SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, USA

Ziege anti-Maus Ig μ SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, USA

2.7.3. Sekundärantikörper für Immunoblots

Esel anti-Ziege IgG-HRP SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, USA

2.7.4. Verwendete Proteine

HEL-Alexa647 Deutsches Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ), Berlin

2.8. Längenstandards

2.8.1. DNA-Standards

100 bp DNA ladder GENE CRAFT, Köln

1 kb DNA ladder GENE CRAFT, Köln

GeneRuler™ Low Range DNA Ladder FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC, Schwerte

GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC, Schwerte

Die **Abbildungen A.18.** und **A.19.** im Anhang zeigen die verwendeten DNA-Längenstandards.

2.8.2. Proteinstandards

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 – 170 kDa) FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC, Schwerte

Die **Abbildung A.20.** im Anhang zeigt den verwendeten Proteinstandard.

2.9. Methoden der Zellbiologie

2.9.1. Zellkultur

Bei der Kultivierung von Zellen wurden bestimmte Verhaltensregeln beachtet, um ein steriles Arbeiten zu gewährleisten: Instrumente zur Präparation von Organen (Scheren, Pinzetten) wurden bei trockener Hitze sterilisiert. Verwendete Puffer und Medien wurden entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Beim Umgang mit eukaryotischen Zellen wurde ausschließlich unter der Sterilwerkbank gearbeitet.

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Zelllinien und murinen Primärzellen in RPMI-1640 oder DMEM (beide von PAA LABORATORIES/GE HEALTHCARE, Freiburg), supplementiert mit 10% FCS, 100 mM Hepes, 20 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 50 μ M 2-Mercaptoethanol, kultiviert (cRPMI-1640 bzw. cDMEM).

2.9.2. Herstellen einer Einzelzellsuspension

Kulturmedium: cRPMI-1640 oder cDMEM

Erythrozytenlyse-Puffer: 0,01 M KHCO_3 ; 0,15 M NH_4Cl ; 0,1 mM EDTA; pH 7,5

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, Milz und inguinale Lymphknoten entnommen und durch Zerreiben durch ein 70 μ m-Zellsieb eine Einzelzellsuspension in Kulturmedium hergestellt. Nach Zentrifugation (1300 rpm, 4°C, 6 min) erfolgte die Erythrozytenlyse durch Zugabe von 1 bis 2 ml Erythrozytenlyse-Puffer zum resuspendierten Zellpellet. Die Reaktion wurde durch Aufnahme in Kulturmedium nach 1 min abgestoppt, anschließend wurde der Ansatz analog den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert und es erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer.

2.9.3. Isolation und Kultivierung von murinen Knochenmarkszellen

2% FCS/PBS: PBS mit 2% (vol/vol) FCS

Kulturmedium: cDMEM (20% FCS)

Zytokine: 20 ng/ml IL-3 (BPV-Überstand); 50 ng/ml IL-6; 10 ng/ml IL-7; 100 ng/ml Flt3-L; 20 ng/ml SCF

Erythrozytenlyse-Puffer: 0,01 M KHCO_3 ; 0,15 M NH_4Cl ; 0,1 mM EDTA; pH 7,5

Die Knochenmarkspendermäuse wurden circa 48 h nach Applikation des 5-FU (siehe Abschnitt 2.13.1.) durch zervikale Dislokation getötet, Femur und Tibia steril entnommen und in 2% FCS/PBS gelagert. Mit einer kleinen Schere wurden Sehnen und Muskelfleisch sowie sämtliche Gelenke entfernt. In einer 10 ml-Spritze wurde 2% FCS/PBS aufgezogen und schließlich mit einer 21 xG- bzw. 23 xG-Kanüle das Knochenmark aus Femur und

Tibia ausgespült bis die Knochen weiß erschienen. Das isolierte Knochenmark wurde über ein 70 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Falcon Röhrchen filtriert und für 10 min bei 1200 rpm bei RT zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in cDMEM resuspendiert, 10 µl Zellsuspension entnommen, mit Erythrozytenlysepuffer versetzt und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Pro 150mm-Petrischale wurden 6×10^7 Knochenmarkszellen in 30 ml cDMEM bei 37°C und 5% CO₂ für 48 h inkubiert.

2.9.4. Infektion von Zelllinien zum *in vitro*-Nachweis der Oberflächenexpression des retrogenen MD4 BZR

Kulturmedium: OptiMEM (LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt)

Supplemente: 10% FCS; 100 mM Hepes; 20 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin;
50 µM 2-Mercaptoethanol; 3% IL-7-Überstand; L-Glutamin; Na-Pyruvat

Polybren: 4 mg/ml

Die Pro-B-Zelllinie R5B (*rag2*^{-/-}) wurde zum *in vitro*-Nachweis der Oberflächenexpression des generierten rekombinanten MD4 BZR verwendet, da sie keine endogenen B-Zell-Rezeptoren respektive IgM-Moleküle besitzt, jedoch das für eine Oberflächenexpression des BZR notwendige Igα exprimiert. Für die Virusinfektion wurden pro Ansatz 5×10^5 Zellen in einem 15 ml-Falcon in 200 µl frischem Kulturmedium resuspendiert, 1,8 ml entsprechender Virusüberstand sowie zur verbesserten Virusaufnahme 2 µl Polybren zugegeben und für 3,5 h bei 3300 rpm 33°C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml frischem Medium aufgenommen und für ~ 48 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert (48 well-Platte). Schließlich wurde der Erfolg der Virusinfektion (Anteil GFP⁺) sowie die Oberflächenexpression des rekombinanten Igμ-BZR durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden die transduzierten Zellen in FACS-Tubes überführt, mit PBA gewaschen und das resuspendierte Zellpellet mit Fluorochrom- gekoppelten Igμ- und κ-spezifischen Antikörpern für ~ 15 min auf Eis bei Dunkelheit inkubiert. Nach einem Waschschriff konnte die FACS-Analyse erfolgen; die Zellpellets wurden dazu in 350 µl PBA resuspendiert.

2.9.5. Transduktion von Knochenmarkszellen für retroviralen Gentransfer

Kulturmedium: cDMEM (20% FCS)

Zytokine: 20 ng/ml IL-3 (BPV-Überstand); 50 ng/ml IL-6; 10 ng/ml IL-7; 100 ng/ml Flt3-L;
20 ng/ml SCF

Zur verbesserten retroviral vermittelten Transduktion der Knochenmarkszellen, wurden die Zellkulturschalen mit rekombinantem humanem Fibronectin-Fragment CH296 (rFN-CH296), RetroNectin® (TAKARA Bio Europe), beschichtet. Durch diese Beschichtung

werden die Zielzellen und die Virione auf den rFN-CH296 Molekülen ko-lokalisiert, wobei die Zielzellen über die Integrin-Rezeptoren VLA-4 oder/und VLA-5 an die rFN-CH296-Untereinheiten binden. Die Beschichtung der Zellkulturplatten (24 well; 40 µg/ml; 0,5 ml RetroNectin® pro well) erfolgte am Vortag der Transduktion; die Platten wurden mit Frischhaltefolie umwickelt und ÜN bei 4°C inkubiert. Die beschichteten Zellkulturplatten wurden am nächsten Tag zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend eine Blockierung (2% BSA/PBS) für 30 min bei RT durchgeführt. Pro well wurde 2 ml Virus-überstand (frisch oder aus -80°C) für zweimal 2 h bei 2000 g 32°C aufzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die zu transduzierenden Knochenmarkszellen ($1,3 - 2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zugegeben und ÜN bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die transduzierten Knochenmarkszellen geerntet, gründlich mit PBS gewaschen und für die Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfängermäuse auf 4×10^6 Zellen/200 µl eingestellt. Ein Teil der transduzierten Zellen wurde für circa 3 bis 5 Tage unter den oben genannten Bedingungen weiter kultiviert und schließlich durchflusszytometrisch analysiert.

2.9.6. Kultur und Kryokonservierung von Zelllinien

Kulturbedien: cRPMI-1640 bzw. cDMEM

Supplemente: 10% FCS; 100 mM Hepes; 20 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin;
50 µM 2-Mercaptoethanol

Einfriermedium: 40% FCS; 20% DMSO; 40% nicht supplementiertes Medium

10x PBS: 80g NaCl; 2g KCl; 14,4g Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 2g KH₂PO₄ ad 1l H₂O; pH 6,63 mit HCl einstellen, autoklavieren

Trypsin/EDTA: (1x) 2,5 g Trypsin + 0,2 g EDTA in HBSS

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden entsprechend ihres Wachstums in Zellkulturschalen (adhärent) bzw. -flaschen (Suspensionszellen) bei 37°C, einer Atmosphäre mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in Begasungsbrutschränken kultiviert. Sämtliche Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen in einer Laminarbox statt. Die verwendeten Zelllinien und die entsprechenden Vollmedien sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

Zum Passagieren von konfluenten Zellen wurden diese mit sterilem 1x PBS gewaschen und unter Einwirkung von Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. In einem sich anschließenden Waschschrift mit Vollmedium und einer Zentrifugation bei 4°C, 1200 rpm, 6 min wurden sowohl das bei längerer Einwirkung zellschädigende Trypsin als auch abgestorbene Zellen und Zelltrümmer aus der Suspension entfernt. Nach dem Resuspendieren des Zellpellets im entsprechenden Vollmedium wurden die Zellen entweder für eine weitere Kultivierung in

einem adäquaten Verhältnis gesplittet oder für sich anschließende Experimente, für die eine exakte Zellzahlbestimmung nötig war, mittels Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Das Splitten von Suspensionszellen erfolgte durch teilweises Absaugen der Zellsuspension und adäquates Verdünnen mit frischem Vollmedium.

Zur Kryokonservierung wurden Zellen einer zu 70 bis 80% konfluent bewachsenen Kulturschale bzw. -flasche zunächst geerntet, mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1VT Kulturmedium resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und mit je 1VT Einfriermedium vermischt. Die Röhrchen wurden in einer Isopropanol-gefüllten Kryobox bei -80°C ÜN eingefroren und zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff transferiert. Zum Anlegen einer neuen Kultur geringer Passage-Anzahl wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen im 37°C Wasserbad aufgetaut. Durch zwei Waschschrte (Aufnahme in je 10 ml vorgewärmtem Vollmedium und Pelletieren bei 4°C, 1200 rpm, 6 min) wurde das DMSO des Einfriermediums entfernt. Anschließend wurden die Zellen in einem adäquaten Volumen Vollmedium resuspendiert und in das Kulturgefäß überführt

2.10. Transfektion von Zelllinien

2.10.1. Calciumphosphat-Transfektion

<u>Kulturmedium:</u>	cDMEM
<u>25 mM Chloroquin:</u>	auf 100 ml mit MilliQ-H ₂ O auffüllen; steriltfiltrieren und aliquotiert bei -20°C lagern
<u>2 M CaCl₂:</u>	in Hepes; pH 7,2; auf 100 ml mit MilliQ-H ₂ O auffüllen; steriltfiltrieren; aliquotieren und bei 4°C lagern
<u>2 x HBS:</u>	50 mM Hepes; 10 mM KCl; 12 mM Glucose; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O auf 480 ml mit MilliQ-H ₂ O auffüllen; pH auf 7,04 einstellen; auf 500 ml mit MilliQ-H ₂ O auffüllen und pH-Wert auf 7,05 einstellen
<u>10x PBS:</u>	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
<u>PBA:</u>	1x PBS; 0,25% BSA; 0,02% Natriumazid

Die PhoenixEco Zellen (Swift, Lorens et al. 2001) wurden am Vortrag der Transfektion zu je 4 x 10⁶ Zellen in einer 100mm-Kulturschale in 8 ml Kulturmedium ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden pro Ansatz 50 µl 25 mM Chloroquin zu den Zellen pipettiert und diese bis zur Zugabe der DNA-CaPO₄-Präzipitate zurück in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gestellt. In einem sterilem Reaktionsgefäß wurden pro Ansatz 20 µg Plasmid-DNA (= 7 µg Retrovirales Plasmid + 10 µg pGagPol R690 + 3 µg pEnv #522) in 1 ml sterilem ddH₂O verdünnt und mit 125 µl 2 M CaCl₂ gemischt. Mithilfe einer 1 ml Plastikpipette wurde Luft im DNA-Wasser-CaCl₂-Gemisch erzeugt und gleichzeitig tropfenweise 1 ml 2 x HBS hinzuge tropft. Nach circa 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der

DNA-CaPO₄-Mix tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch vorsichtiges Umschwenken der Kulturschalen gemischt. Die Präzipitate wurden 6 bis 8 h nach der Transfektion von den Zellen entfernt und durch jeweils 6 ml frisches Kulturmedium ersetzt. 48 h nach Transfektion wurde das virushaltige Medium entfernt, über einen 0,2 µm Filter filtriert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Zum selben Zeitpunkt wurde ein Teil der Zellen durch Auf- und Niederpipettieren mit eiskaltem PBA abgelöst, in große FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 350 µl PBA gut resuspendiert und der Anteil transfizierter Zellen (GFP⁺) mithilfe eines Durchflusszytometers bestimmt.

2.10.2. Lipofectamine™-Transfektion

<u>Kulturmedium:</u>	DMEM Medium
<u>Supplemente:</u>	10% FCS; 100 mM Hepes; 20 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin; 50 µM 2-Mercaptoethanol
<u>OptiMEM:</u>	LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt
<u>10x PBS:</u>	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, pH 7,2; autoklavieren
<u>PBA:</u>	1x PBS; 0,25% BSA; 0,02% Natriumazid

Die CHO-K1 Zellen wurden circa 24 h vor der Transfektion zu je 4 x 10⁶ Zellen in einer 100mm-Petrischale in 10 ml Kulturmedium ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden in einem sterilem Reaktionsgefäß pro Ansatz 24 µg Plasmid-DNA (= 8,4 µg Retrovirales Plasmid + 12 µg pGagPol R690 + 3,6 µg pEnv #522) mit 1,5 ml OptiMEM-Medium (auf RT erwärmt) gemischt. In einem weiteren sterilen Reaktionsgefäß wurden pro Ansatz 60 µl Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz mit 1,5 ml OptiMEM (auf RT erwärmt) gemischt und für ~ 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das DNA-OptiMEM-Gemisch dem Lipofectamine-OptiMEM-Gemisch zugegeben, vorsichtig gemischt und bei RT für circa 20 min inkubiert. Schließlich wurden die Transfektionsansätze tropfenweise vorsichtig zu den Zellen gegeben und für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und ein Teil der Zellen durch Auf- und Niederpipettieren mit eiskaltem PBA abgelöst, in große FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 350 µl PBA gut resuspendiert und der Anteil transfizierter Zellen (GFP⁺) mithilfe eines Durchflusszytometers bestimmt. Nach erfolgreicher Transfektion (mind. 40% GFP⁺) wurden die restlichen Zellen des Transfektionsansatzes zur Analyse im Western Blot lysiert.

2.11. Zell-Lyse für Western Blot (ECL)

Zell-Lysepuffer: 20 mM Hepes pH 7,5; 10 mM EGTA; 40 mM β -Glycerophosphat; 1% Triton X-100;
2,5 mM $MgCl_2$; 2 mM Na-Orthovanadat; 1 mM DTT; 20 μ g/ml Aprotinin; 20 μ g/ml
Leupeptin

Die zu lysierenden Zellen ($\sim 4 \times 10^6$ Zellen) wurden aus den Kulturgefäßen in sterile 15 ml-Falcons überführt (adhärente Zellen wurden durch Trypsinieren gelöst) und zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 300 μ l Lysepuffer gut resuspendiert und durch 10-minütige Inkubation auf Eis lysiert. Der nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C (Tischzentrifuge) erhaltene Überstand mit den löslichen Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung im Western Blot bei -80°C gelagert.

2.12. Durchflusszytometrie und FACS

2.12.1. Lebend-Tot-Ausschluss

PBS 1x: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 7,9 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$

PBA: 0,25% BSA (w/v); 0,02% Natriumazid (w/v) in PBS

PBA-S: 0,5% Saponin (v/v) in PBA

2% PFA: (w/v) in PBS

Der Lebend-Tot-Ausschluss erfolgte entweder durch Färbung der Zellen mit *LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit* oder direkt vor der durchflusszytometrischen Analyse durch Zugabe von Propidium-Iodid (pi; 0,5 μ g/ml). Für die Färbung mit dem aminreaktiven Lebend-Tot-Farbstoff (ViD, *viability dye*), wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, um Proteinreste zu entfernen. ViD (*LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit*) wurde 1:500 in PBS verdünnt. Die Zellen wurden mit 50 μ l der Verdünnung 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert und anschließend einmal mit PBS und einmal mit PBA (für die nachfolgende Oberflächenfärbung) gewaschen.

2.12.2. Oberflächenfärbung

PBA: 0,25% BSA (w/v); 0,02% Natriumazid (w/v) in PBS

1x PBS: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 7,9 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$; pH 7,2; autoklavieren

Für die Oberflächenfärbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern wurden pro Färbung 1×10^6 Zellen in ein kleines FACS-Tube überführt und zweimal mit je 1 ml PBA gewaschen (1300 rpm, 6 min, 4°C). Zur Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte eine 8-minütige Inkubation auf Eis des resuspendierten Zellpellets mit anti-CD16/CD32 (10 μ g/ml) und Ratten-IgG (10 μ g/ml) in PBA. Die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper

wurden entsprechend der in **Tabelle 4** angegebenen Titer in PBA verdünnt, zu den Proben gegeben, gut gemischt und für 10 min auf Eis und in Dunkelheit inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Inkubation (8 min) mit dem Streptavidin-Konjugat bei Proben mit biotinyliertem Primär-AK. Nach zwei weiteren Waschschriften (1 ml PBA; 1300 rpm, 6 min, 4°C) wurden die Proben in jeweils 250 µl PBA resuspendiert und am LSR II (BD BIOSCIENCES) analysiert.

Zur Vermeidung überlappender Emissionspektren bei Verwendung mehrerer Fluorochrome, erfolgte eine Kompensation mithilfe von Kompensationspartikeln (*Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control (FBS) Compensation Particles Set* bzw. *Anti-Rat Ig, κ/Negative Control (FBS) Compensation Particles Set*; beide BD BIOSCIENCES). Pro Färbung bzw. eingesetztem Fluorochrom wurde dazu je ein Tropfen der *Anti-Mouse/Rat Ig* und der *κ/Negative Control* in ein großes FACS-Tube gegeben, mit den jeweiligen Fluorochromgekoppelten Antikörpern für circa 10 min im Dunkeln inkubiert und mit PBA gewaschen (1300 rpm, 6 min, 4°C). Bei Verwendung eines biotinylierten Primärantikörpers wurden die Kompensationspartikel mit Streptavidin gekoppelt an das gewünschte Fluorochrom für weitere 10 min im Dunkeln inkubiert, anschließend mit PBA gewaschen und zur automatischen Kompensation am LSR II (BD BIOSCIENCES) in 300 µl PBA resuspendiert.

2.12.3. Intrazelluläre Färbung

PBA: 0,25% BSA (w/v); 0,02% Natriumazid (w/v) in PBS

1x PBS: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O; pH 7,2; autoklavieren

PBA-S: 0,5% Saponin (v/v) in PBA

2% PFA: (w/v) in PBS

Nach Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Fixierung der Zellen mit 2% PFA in PBS für 20 min auf Eis, das wiederum durch die Zugabe von PBA gestoppt wurde. Die Zellen wurden bei 1300 rpm und 4°C 6 min zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen mit einem Saponin-haltigen Puffer (PBA-S) gewaschen. Saponin permeabilisiert die Zellen, so dass die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper in die Zellen diffundieren können. Als nächstes wurden die unspezifischen Bindungen mit anti-CD16/CD32 (10 µg/ml) in PBA-S für 8 min blockiert. Im Anschluss wurden die Fluorochrom-markierten Antikörper in PBA-S entsprechend verdünnt und für weitere 10 min mit den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBA-S und einmal mit PBA gewaschen, um die geöffneten Poren wieder zu verschließen. Zum Schluss wurden die Zellen in 300 µl PBA aufgenommen und im Durchflusszytometer (BD LSR II) analysiert.

2.12.4. Sortierung mittels MACS

<u>1x PBS:</u>	136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 7,9 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; pH 7,2; autoklavieren
<u>MACS-Running-Buffer (= MACS-Puffer):</u>	2 mM EDTA; 0,5% BSA/PBS (w/v)
<u>MACS-Rinsing-Solution:</u>	2 mM EDTA in 1x PBS
<u>MACS-Cleaning-Solution:</u>	70% (v/v) Ethanol

Die magnetische Zellsortierung am AutoMACS (MACS[®] – *magnetic cell sorting*) diente der Anreicherung der B-Lymphozyten aus Milz-Einzelzellsuspensionen HEL-transgener MD4-Mäuse, indem die T-Lymphozyten mittels CD90 depletiert wurden. Die Milz-Einzelzellsuspension (siehe Abschnitt 2.9.2.) wurde zunächst zweimal in MACS-Puffer (1300 rpm, 6 min, 4°C) gewaschen. Pro 1×10^7 Zellen wurden 10 µl CD90-MicroBeads und 90 µl MACS-Puffer zugegeben, gut durchmischt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Um ungebundene MACS-Beads zu entfernen, wurde der Ansatz mit MACS-Puffer gewaschen und das ebenfalls in MACS-Puffer resuspendierte Pellet anschließend über einen 30 µm-Präseparationsfilter gegeben, bevor die Zellsortierung am AutoMACS[®] erfolgen konnte. Zur Separation wurde das Programm *DepleteS* gewählt. Von beiden nach AutoMACS-Sortierung erhaltenen Fraktionen wurde die Zellzahl bestimmt (Neubauer Zählkammer) und die CD90-negative Fraktion für die Sortierung der Antigen-spezifischen B-Lymphozyten (IgM^{a+}) am FACS Aria eingesetzt (siehe nachfolgender Abschnitt 2.12.5.).

2.12.5. Sortierung Lysozym-spezifischer Zellen mittels FACS Aria

<u>1x PBS:</u>	136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 7,9 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; pH 7.2, autoklavieren
<u>MACS-Running-Buffer (= MACS-Puffer):</u>	2 mM EDTA; 0,5% BSA/PBS (w/v)

Das Prinzip der Sortierung von Zellen mittels BD FACS Aria basiert auf demselben wie die Analyse von Zellen im Durchflusszytometer. Aus diesem Grund werden auch für diese Methode Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper verwendet. Der Unterschied zum BD LSR II besteht darin, dass die Zellen aufgefangen und entsprechend der markierten Antikörper sortiert werden können. Für die Klonierung des rekombinanten MD4 BZR wurden die Antigen-spezifischen B-Lymphozyten aus Milzeinzelzellsuspensionen der MD4 transgenen Mäuse mithilfe eines Fluorochrom-gekoppelten anti-mouse IgM^a-Antikörpers aus der nach AutoMACS-Separation erhaltenen CD90-negativen Fraktion am FACS Aria sortiert. Die Reinheit der Sortierung wurde in einer anschließenden FACS-Analyse verifiziert. Sortierte Zellen mit einer Reinheit von < 95% wurden abzentrifugiert (Tischzentrifuge; 3500

rpm, 10 min, 4°C), die Zellpellets mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.13. Tierversuche

Für alle Tierexperimente wurden Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen eingesetzt. Die Tiere wurden am Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena gehalten und gezüchtet. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden, Fütterung mit Altromin-Pellets # 1326, Wasser *ad libitum*). Alle Manipulationen der Versuchstiere wurden ausschließlich durch qualifizierte Personen durchgeführt. Die Tierversuche waren vom Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt (Reg.-Nr. 02-038/06).

2.13.1. Applikation des 5-Fluorouracil (5-FU)

48 h vor Isolation der Knochenmarkszellen (siehe Abschnitt 2.9.3.) wurde den Knochenmarksspendern 0,15 mg/g Körpergewicht 5-FU injiziert. Für die intraperitoneale (i.p.) Applikation wurde das 5-FU in sterilem PBS in einer Konzentration von 10 mg/ml verdünnt und luftblasenfrei in einer Spritze aufgezogen. Die Mäuse wurden am Nacken und am Rücken so gefasst, dass sie in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt waren und eine gefahrlose Applikation des 5-FU ins Peritoneum möglich war. Die Einstichstelle wurde vor der Applikation desinfiziert. Nach der Injektion des 5-FU wurden die Tiere zurück in den Käfig gesetzt und abgewartet bis die Vitalzeichen dem Normalzustand entsprachen.

2.13.2. Lethale Bestrahlung der Empfängermäuse

Die zu bestrahlenden Tiere wurden von der Tierpflegerin steril in speziell für Nager entwickelte Bestrahlungskäfige (*Rad Disk Rodent Microisolation Irradiator Cage*, Braintree Scientific) gesetzt und für die kurze Dauer des Bestrahlungsvorgangs luftdicht abgeklebt. Die (sub-)lethale Bestrahlung (*rag*^{-/-} 4 Gy, C57BL/6 9 Gy) erfolgte am Leibniz-Institut für Altersforschung/Fritz-Lipmann-Institut e.V. (FLI), Beutenberg Campus mit einer *Gammacell®40 Exactor* Bestrahlungseinheit (Caesiumquelle). Nach erfolgter Bestrahlung wurden die Tiere im Bestrahlungskäfig über die Peressigsäureeschleuse wieder in das Tierhaus 5 des Forschungszentrums Beutenberg eingebracht und in frische Käfige eingesetzt. Die Vitalität der bestrahlten Tiere wurde täglich überprüft.

2.13.3. Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfängerermäuse

Ca. 6 bis 8 h nach Bestrahlung wurden die Tiere durch intravenöse (i.v.) Injektion von mindestens 4×10^6 (transduzierten) Knochenmarkszellen rekonstituiert. Die Schwanzvene wurde zur intravenösen Injektion durch Erwärmen mithilfe einer Rotlichtlampe geweitet.

Dem Trinkwasser der lethal bestrahlten, rekonstituierten Tiere wurde beginnend ab einem Zeitraum von 2 Wochen vor Bestrahlung bis mindestens 2 Wochen nach Bestrahlung Cotrim k (4 mg/ml; Wechsel 2x wöchentlich) zugesetzt und ihre Vitalität täglich überprüft.

2.14. Molekularbiologische Methoden

2.14.1. Isolation von Gesamt-RNA

DEPC-H₂O: 0,1% DEPC v/v: Zugabe von 1 ml DEPC zu 1 l A.dest, Inkubation ÜN bei 37°C, autoklavieren

Die Gesamt-RNA-Isolierung aus den Antigen-spezifischen B-Zellen erfolgte mittels *High Pure RNA Isolation Kit* (Gesamt-RNA) gemäß Herstellerangaben. Die RNA-Ausbeute wurde durch optische Messung bei $\lambda=260$ nm bestimmt und die Qualität der Aufreinigung aus dem Verhältnis von $OD_{\lambda=260nm}$ zu $OD_{\lambda=280nm}$ abgeschätzt. Bei RNA sollte dieser Wert zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Für die folgenden Experimente wurden nur RNA-Präparationen mit diesem A260/A280-Quotienten verwendet. Bis zum weiteren Gebrauch wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.14.2. Isolation genomischer DNA

Verdaupuffer: 50 ml 1M NaCl; 50 ml 1%SDS; 250 ml 0,1M Tris-HCl pH 8,0; 10 ml 0,5M EDTA; ad 450 ml ddH₂O; steril filtrieren; Lagerung bei RT

Proteinase K: 5 mg/ml in sterilem ddH₂O; Aliquotieren à 1ml; Lagerung bei -20°C

Für die Isolation von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien zur Genotypisierung wurden ~ 0,2 cm große Biopsien mit 500 µl Verdaupuffer + 33 µl Proteinase K ÜN, mindestens jedoch für 3 h bei 55°C auf dem Thermomixer (500 rpm) inkubiert. Das Zersetzen des Gewebes wurde optisch kontrolliert.

Nach erfolgter 15-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm, 4°C zum Pelletieren der Zelltrümmer, wurde der erhaltene Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 500 µl 100% Isopropanol und erneuter 20-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm, 4°C gefällt. Das Pellet wurde mit 350 µl 70% Ethanol gewaschen (15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C) und anschließend im Thermomixer bei 37°C (ohne Schütteln) getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 400 µl sterilem

ddH₂O resuspendiert und bei 4°C gelagert. Mithilfe dieses Protokolls isolierte genomische DNA ist für etwa 6 Monate stabil.

2.14.3. cDNA-Herstellung (reverse Transkription)

Prä-Mix: 2 µg RNA + 1 µl Oligo(dT)-Primer (50 µM) ad 17 µl DEPC-H₂O

Reaktionsmix: 1 µl M-MuLV reverse Transkriptase; 5 µl zugehöriger *First Strand Buffer* (5x); 1 µl RNase Inhibitor (RNasin); 1 µl 25 mM dNTP-Mix

Die Gesamt-RNA-Umschreibung der RNA aus den sortierten, HEL-spezifischen B-Zellen erfolgte unter Verwendung der M-MuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) reverse Transkriptase und eines Oligo(dT)-Primers (*Annealing* an Poly(A)⁺ mRNA). Zunächst erfolgte eine 10-minütige Denaturierung der mRNA bei 65°C und eine 2-minütige Hybridisierung der Oligonukleotide an die mRNA bei 4°C durch Inkubation des Prä-Mixes im PCR-Thermocycler. Anschließend wurde der Reaktionsmix zugegeben, die Umschreibung bei 42°C für 1 h durchgeführt und abschließend die reverse Transkriptase 2 min bei 95°C denaturiert. Die erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.14.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Ansatz: 2 µl cDNA bzw. 50 ng Plasmid-DNA; 0,5 bis 1 µl DNA-Polymerase (s.u.); 5 µl 10x Puffer; 1 µl dNTP-Mix; je 0,5 µl 50 µM forward (5') und reverse (3') Primer (**Tab. 3**); ad 50 µl ddH₂O

dNTP-Mix (10 mM each): GENE CRAFT, Köln

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in der vorliegenden Arbeit vielfältig verwendet: Zur DNA-Analyse (Genotypisierung, Screening von Transformanten) erfolgte die Amplifizierung mithilfe der *DreamTaq Green* DNA Polymerase (FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC, Schwerte). Sollte sie hingegen zum Klonieren verwendet werden, wurde mit dem *Expand High Fidelity* PCR System (ROCHE APPLIED SCIENCE, Penzberg) amplifiziert, das eine „Korrektur-lesende“ Aktivität (*proof reading activity*) besitzt. Der PCR-Ansatz wurde in einem PCR-Thermoblock mit Deckelheizung inkubiert. Das PCR-Protokoll wurde entsprechend der verwendeten Primerkombination (*Annealing*) und der daraus resultierenden Amplifikatgröße (*Elongation*) jeweilig angepasst. Die *Annealing*-Temperatur wurde über die „4+2-Faustregel“ abgeschätzt ($T_{\text{Anneal}} = (\sum A/T_{\text{hybrid.}}) * 2^{\circ}\text{C} + (\sum G/C_{\text{hybrid.}}) * 4^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C}$; (Mülhardt 2006)).

2.14.5. Rapid Amplification of cDNA-Ends with Polymerase Chain Reaction (RACE-PCR)

SuperScript III Reverse Transkriptase: 200 U/μl; LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt
Expand High Fidelity PCR System: ROCHE APPLIED SCIENCE, Penzberg

Für die Klonierung des rekombinanten *full length* MD4 Ig μ _{mem} wurden zunächst mithilfe einer RACE-PCR Sequenzinformationen sowohl für das 5'- als auch das 3'-Sequenzende gesammelt, da zu Beginn des Projektes keine *full length* anti-HEL Ig-Sequenzen publiziert waren. Für die RACE-PCR wurde das GeneRacer™ Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

2.14.6. 5' und 3'Nested RACE

SuperScript III Reverse Transkriptase: 200 U/μl; LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt
Expand High Fidelity PCR System: ROCHE APPLIED SCIENCE, Penzberg

Zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität der RACE-Produkte für die 5' und 3'-Sequenzenden der HEL-spezifischen Immunglobulinketten, wurde für beide Ig-Ketten eine 5' sowie eine 3'Nested RACE durchgeführt. Dabei diente 1 μl der ursprünglichen Amplifizierungsreaktion als Template und es wurden sog. *GeneRacer™ Nested primers* verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers.

2.14.7. Klonierung und Analyse von DNA

2.14.7.1. TOPO® TA Cloning®

Mithilfe des *TOPO® TA Cloning® Kits* (LIFE TECHNOLOGIES, Darmstadt) wurden die jeweilig amplifizierten PCR-Produkte in den pCRII® TOPO®-Vektor kloniert. Das *TOPO® TA Cloning®* System erlaubt die direkte Ligation von PCR-Produkten (ohne vorherige Aufreinigung) in den pCRII® TOPO®-Vektor, da dieser linearisiert und mit kovalent gebundener Topoisomerase I vorliegt. Das von der Taq-Polymerase an das 3'Ende des PCR-Produkts angefügte Desoxyadenosin (A) wird von der Topoisomerase mit den 5'-(C/T)CCTT-3' Enden des pCRII® TOPO®-Vektor ligiert, ohne dass eine T4 DNA Ligase notwendig ist.

Die Durchführung des *TOPO® TA Cloning®* erfolgte laut Herstellerangaben. Anschließend wurden die TOPO TA-Klonierungsansätze in chemisch kompetente Bakterien *E.coli* DH5α transformiert (siehe Abschnitt 2.15.2.).

2.14.7.2. ColonyPCR

Die erzeugten Transformanten wurden zunächst in einer ColonyPCR spezifisch auf das Vorhandensein des gewünschten *Inserts* überprüft. Dafür wurden die gewachsenen Klone von den LB-Amp-Platten mit einer Pipettenspitze gepickt und direkt als Template in den PCR-Ansatz gegeben. Nach ColonyPCR erhaltene positive Klone wurden einem analytischen Restriktionsverdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen unterzogen (siehe nachfolgender Abschnitt 2.14.7.3.).

2.14.7.3. Restriktion von DNA

Restriktionsenzyme: *AgeI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *SacII*, *XbaI*, *XhoI* und zugehörige Puffer (NEW ENGLAND BIOLABS (NEB), Frankfurt/Main)

Sowohl ringförmige Plasmid-DNA als auch PCR-Fragmente wurden analytisch bzw. präparativ mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Zur Restriktionshydrolyse von bis zu 5 µg Plasmid-DNA wurden 2 bis 10 *Units* der entsprechenden Restriktionsendonuklease unter Zugabe des zugehörigen 10x Puffers in einem Ansatzvolumen von 20 µl eingesetzt und der Restriktionsansatz bei 37°C (entsprechend des Enzyms) für 2 bis 4 h inkubiert. Sollte ein simultaner Doppelverdau mit zwei Enzymen durchgeführt werden, wurde der entsprechende Puffer laut Empfehlung der NEB-Homepage *Double Digest Finder* [<http://66.155.211.155/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp>] ausgewählt.

2.14.7.4. Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

10x DNA-Probenpuffer: 50% Glycerol; 50mM EDTA pH 8,0; 0,1% Bromphenol-Blau; 0,1% Xylencyanol
50x TAE: 2 M Tris; 0,95 M Essigsäure; 50 mM EDTA; ad 1 l ddH₂O; autoklavieren
Ethidiumbromid-Stocklösung: 10 mg/ml in H₂O

Zur Kontrolle der Konzentration, Reinheit oder Größe von DNA-Fragmenten bzw. zu deren präparativer Auftrennung wurde die Probe mit 10x DNA-Probenpuffer versetzt (ausgenommen mit *DreamTaq* und *DreamTaq Green Buffer* amplifizierte PCR-Proben) und einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Dabei wurde die entsprechende Menge Agarose (1, 1,5 oder 2%) in 1x TAE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung Ethidiumbromid in einer Konzentration 0,5 µg/ml Agaroselösung zugesetzt und das Gel im Schlitten der Gelapparatur mit eingesetztem Probentaschenkamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels, dem Auffüllen der Gelapparatur mit 1x TAE-Puffer sowie dem Auftragen der Proben bzw. des Längenstandards wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt (konstant 100 V). Auf-

grund des DNA-interkalierenden Ethidiumbromids und dessen Fluoreszenz konnten unter UV-Licht die DNA-Fragmente sichtbar und das Gel photographisch dokumentiert werden.

2.14.7.5. Gelelution von DNA-Fragmenten

Die Elution von DNA aus Agarosegel-Fragmenten erfolgte mittels *Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System Kit* (PROMEGA, Mannheim) nach Herstellerangaben, wobei die DNA mit 25-50 µl autoklaviertem, destilliertem H₂O vom Säulenmaterial eluiert wurde. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mithilfe eines Photometers bestimmt.

2.14.7.6. Ligation

Ligationsansatz: 1 U T4 DNA-Ligase; 2 µl 10x Ligasepuffer; ca. 50 ng Plasmid-DNA; ca. 150 ng *Insert*-DNA; ad 20 µl H₂O

Nach der Restriktion der zu ligierenden DNA wurden das *Insert*fragment und der linearisierte Vektor (ca. im Verhältnis 3:1 zur Vektor-DNA-Menge) vermischt. Der Ligationsansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend komplett in einer Transformation eingesetzt.

2.14.7.7. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Präparationen wurde photometrisch durch Messung der Extinktion der Probe in Quarzküvetten bei den Wellenlängen $\lambda=260$ nm bzw. $\lambda=280$ nm bestimmt (Photometer WPA *biowave*, BIOCHROM, Cambridge, GB). Dabei stützte sich die Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA auf die Berechnung $\text{cDNA} [\mu\text{g/ml}] = 50 \cdot \text{OD}_{\lambda=260\text{nm}}$. Um die Reinheit einer DNA-Präparation zu kontrollieren, wurde der Quotient aus den Extinktionen bei beiden Wellenlängen gebildet ($\text{OD}_{\lambda=260\text{nm}} / \text{OD}_{\lambda=280\text{nm}}$), wobei reine DNA-Präparationen einen Quotienten zwischen 1,7 und 2,0 aufweisen sollten.

2.14.7.8. DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle der Klonierungen wurden die DNA-Proben zur Sequenzierung an den Sequenzierservice der AGOWA/LGC GENOMICS, Berlin, geschickt. Die Proben wurden dafür entsprechend den Angaben des Sequenzierservices vorbereitet.

2.15. Kultur, Transformation und Kryokonservierung von Bakterien

2.15.1. Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien

LB-Medium: 1% NaCl; 1% Trypton; 0,5% Hefe-Extrakt; pH 7,5; autoklavieren

LB-Agar-Platten: LB + 1,5% Agar

Selektionsmedium: LB (Agar) + 100 mg/l Ampicillin

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml Ampicillin in 50% Ethanol

Bakterien in Flüssigkulturen wurden aerob über Nacht bei 37°C (Brutraum) auf einem Schüttler (ca. 200 rpm) inkubiert. Zur Anzucht von transformierten Kulturen (GVOs, Ampicillin-Resistenz) wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (Endkonzentration des Ampicillins 100 mg/l) zugesetzt. Für Plasmid-DNA-Minipräparationen wurde ein Volumen von 10 ml LB (Amp) mit einer Bakterienkolonie bzw. für DNA-Maxipräparationen ein Kulturvolumen von 500 ml beimpft. Zum Anlegen von Bakterienglycerolstocks (Kryokonservierung) wurden 500µl Glycerol mit 750µl Bakterien-ÜNK steril in Kryoröhrchen gemischt und bei -80°C gelagert.

2.15.2. Erzeugung kompetenter Bakterien und Transformation

φa-Medium: 0,5% Hefe-Extrakt; 2% Trypton; 40 mM MgSO₄; mit KOH auf pH 7,6 einstellen; autoklavieren

TFBI Puffer: 30mM KOAc; 100mM RbCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15% Glycerol; mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 einstellen; sterilfiltrieren

TFBII Puffer: 10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15% Glycerol; mit KOH auf pH 6,5 einstellen; sterilfiltrieren

E.coli DH5α-Bakterien wurden zunächst in einer Vorkultur mit φa-Medium steril überimpft und ÜN im 37°C-Schüttler inkubiert. Nach einer 1:50-Verdünnung dieser Vorkultur in 100 ml φa-Medium erfolgte eine weitere Inkubation, bis eine OD($\lambda=595$ nm) = 0,5 der Kultur erreicht war. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 3000 rpm, 4°C wurden die Bakterien pelletiert, anschließend in 40 ml kaltem TFBI-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 4 ml kaltem TFBII-Puffer resuspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Aliquots à 100 µl dieser Zellsuspension wurden in vorgekühlte, sterile Reaktionsgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Transformation bei -70°C gelagert. Nach dem Auftauen durch 10-minütige Inkubation auf Eis wurde zu einem 100 µl-Aliquot chemisch kompetenter *E.coli* DH5α bei einer Klonierung der gesamte 20 µl-Ligationsansatz bzw. bei einer Retransformation ca. 50 ng Plasmid-DNA zugegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 sek wurden die Zellen 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 900 µl antibiotikafreiem LB-Medium versetzt. Einer ein-

stündigen Inkubation unter Schütteln (1200 rpm) bei 37°C zur Expression des plasmidcodierten, resistenzvermittelnden Genes (z.B. β -Lactamase bei Ampicillinresistenz) folgte das Ausstreichen der Transformationsansätze (vorher bei 3000 rpm, 5 min pelletiert) auf den Selektionsplatten (LB-Amp), die ÜN bei 37°C zum Wachstum der transformierten Klone inkubiert wurden.

2.15.3. Plasmidisolation aus *E.coli* (DNA-Mini-/Maxipräparation)

Die saubere Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* im geringen Maßstab erfolgte laut Herstellerprotokoll zum *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (PROMEGA, Mannheim). Die Plasmid-DNA aus 10 ml einer ÜNK wurde in 50 μ l destilliertem H₂O aufgenommen und ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Zur Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde das *Pure Yield Plasmid MaxiPrep System* (PROMEGA) verwendet. Die Präparation wurde nach den entsprechenden Vorschriften des Herstellers vorgenommen, wobei die Plasmid-DNA in 750 μ l destilliertem H₂O aufgenommen und ihre Konzentration photometrisch bestimmt wurde.

2.16. Proteinbiochemische Methoden

2.16.1. Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels BCA

Der *BCA Protein Assay* (THERMO SCIENTIFIC, Schwerte) wurde laut Herstellerangaben in Mikrotiterplatten mit je 10 μ l Probe bzw. Albumin-Standard (Verhältnis Probe zu Arbeitslösung 1:20) durchgeführt.

2.16.2. SDS-PAGE

<u>Acrylamidlösung:</u>	29,2 g/ 100 ml Acrylamid; 0,8 g/100 ml N'N'-bis-methylen-acrylamid in 300 ml ddH ₂ O lösen; filtrieren; bei 4°C lagern
<u>10% APS:</u>	5 g Ammoniumpersulfat in 50 ml ddH ₂ O lösen; Lagerung bei -20°C
<u>4x Trenngelpuffer, pH 8,8 (0,5 l):</u>	1,5 M Tris-HCl; 0,4% SDS; Tris-HCl in 300 ml ddH ₂ O lösen und pH auf 8,8 einstellen; mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen; 2 g SDS zugeben und lösen; bei 4°C lagern
<u>4x Sammelgelpuffer, pH 6,8 (100 ml):</u>	0,5 M Tris-HCl; 0,4% SDS; Tris-HCl in 60 ml ddH ₂ O lösen und pH auf 6,8 einstellen; mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen; 0,4 g SDS zugeben und lösen; bei 4°C lagern
<u>10x Running Buffer, pH 8,3:</u>	250 mM Tris; 2 M Glycin; 1% SDS; in 1l ddH ₂ O lösen; vor Gebrauch 1:10 verdünnen
<u>6x Probenpuffer:</u>	375 mM Tris pH 6,8; 12% SDS; 30% Glycerol; 500 mM DTT; 0,001% Bromphenolblau

Die SDS-PAGE erfolgte nach Laemmli (Laemmli 1970). Das SDS-Polyacrylamidgel bestand aus einem 5%-igen Sammelgel und einem 12%-igen Trenngel. Die Proben wurden

mit 6x denaturierendem Probenpuffer versetzt und durch Kochen bei 95°C für 5 min denaturiert. Es wurden jeweils 15 µg Gesamtproteinlysate eingesetzt, um Proben miteinander vergleichen zu können. Die Elektrophorese erfolgte unter konstanter Spannung von 100 bis 125V.

2.16.3. Transfer und Immunoblot (Western Blot)

<u>Transferpuffer pH 8,3:</u>	25 mM Tris-Base; 150 mM Glycin; 10% Methanol
<u>10 x TBS:</u>	0,5 M Tris; 1,5M NaCl; ad 1000 ml mit ddH ₂ O; pH 7,2
<u>TTBS:</u>	0,05% Tween-20 in TBS; ad 500 ml TBS
<u>Blocking-Solution:</u>	5% Trockenmilch in 1x TTBS

Die Nitrocellulosemembran (PROTRAN SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) wurde in ddH₂O und anschließend in Transferpuffer äquilibriert, bevor das ‚Blot-Sandwich‘ luftblasenfrei zusammengebaut werden konnte. Der Anode (+) folgten drei, ebenfalls in Transferpuffer getränkte, Whatman-Papiere, anschließend die aktivierte Nitrocellulosemembran, darauf das SDS-Gel, dann wiederum drei angefeuchtete Whatman-Papiere und zuletzt die Kathode (-). Geblottet wurde für 2,5 h bei 2,5 mA/cm² Membranfläche.

Im Anschluss daran wurde die Membran durch 2-stündige Inkubation bei 4°C in 5% TM/TTBS geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Ziege anti-Maus IgG 1:1000 verdünnt in 5% BSA/TTBS beziehungsweise Ziege-anti-Maus IgG 1:1000 verdünnt in 2% TM/TTBS, jeweils bei 4°C). Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in 1x TTBS wurde mit dem sekundären Antikörper (Esel anti-Ziege IgG-HRP, jeweils 1:1000 verdünnt in 5% TM/TTBS) inkubiert. Dies erfolgte für 2 h rotierend bei 4°C. Danach wurde die Nitrocellulosemembran erneut dreimal für je 5 min in 1x TTBS gewaschen und schließlich das Substrat (1 ml SuperSignal West Pico Luminol/*Enhancer Solution* + 1 ml SuperSignal West Pico *Stable Peroxide Solution*) zugegeben, für 30 sek im Dunkeln inkubiert und zur Visualisierung ein Film (Kodak X-OMAT UV plus) belichtet und entwickelt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Klonierung des rekombinanten MD4 B-Zell-Rezeptors

Als Modell für die erstmalige Generierung BZR-retrogener Mäuse wurde der gut charakterisierte MD4 BZR gewählt. Dieser erkennt spezifisch Lysozym (*Hen-Egg-Lysozyme*, HEL) (Goodnow, Crosbie et al. 1988). Die **Abb. 6** zeigt schematisch den Aufbau der für den rekombinanten HEL-Ig μ_{mem} BZR kodierenden Expressionskassette von der mRNA bis zum fertigen Molekül nach kotranslationaler Prozessierung. Die Ig μ -Kette ist das stromaufwärts gelegene Genprodukt. Seine Sequenz beinhaltet die am 5'-Ende befindliche Signalsequenz, jedoch kein Stopcodon am 3'-Terminus, um eine durchgehende Translation des gesamten Konstruktes zu ermöglichen. Da der BZR in der Zellmembran verankert sein soll, wurde die membranständige Transkriptvariante der Ig μ -Kette verwendet (anstelle der löslichen Variante). Stromabwärts von der Ig μ -Kette befinden sich zunächst die Furin- und 2A-Proteasesequenzen, gefolgt von der HEL-spezifischen Ig κ -Kette. Die Sequenz der HEL-spezifischen Ig κ -Kette besitzt sowohl eine Signalsequenz als auch ein Stopp-Codon. Eine detaillierte Darstellung des DNA-Konstruktes ist der **Abb. 8C und D** zu entnehmen.

Während der Translation erfolgt eine Spaltung innerhalb der 2A-Proteasesequenz. Die 2A-Protease gewährleistet die stöchiometrische Expression der beiden Ig-Ketten nach der Translation (siehe auch Abschnitt 1.6.). Ein Teil der 2A-Sequenz verbleibt danach am C-Terminus des stromaufwärts gelegenen Proteins. Bisher sind keine negativen Auswirkungen auf die Funktion des stromaufwärts gelegenen Proteins bekannt. Um die uneingeschränkte Funktionsweise der stromaufwärtsgelegenen Ig μ_{mem} -Kette sicher zu stellen, wurde zwischen die Sequenz der Ig μ_{mem} -Kette und der 2A-Protease eine sog. Furin-Spaltstelle eingefügt. Sie bewirkt ein zweites Spaltereignis, wonach die Ig μ_{mem} -Kette ohne weitere Sequenzanhänge vorliegt (**Abb. 6C**). Die beiden Ig-Ketten können sich nun im ER zu einem funktionsfähigen BZR zusammenlagern, bevor sie an die Zelloberfläche transportiert werden.

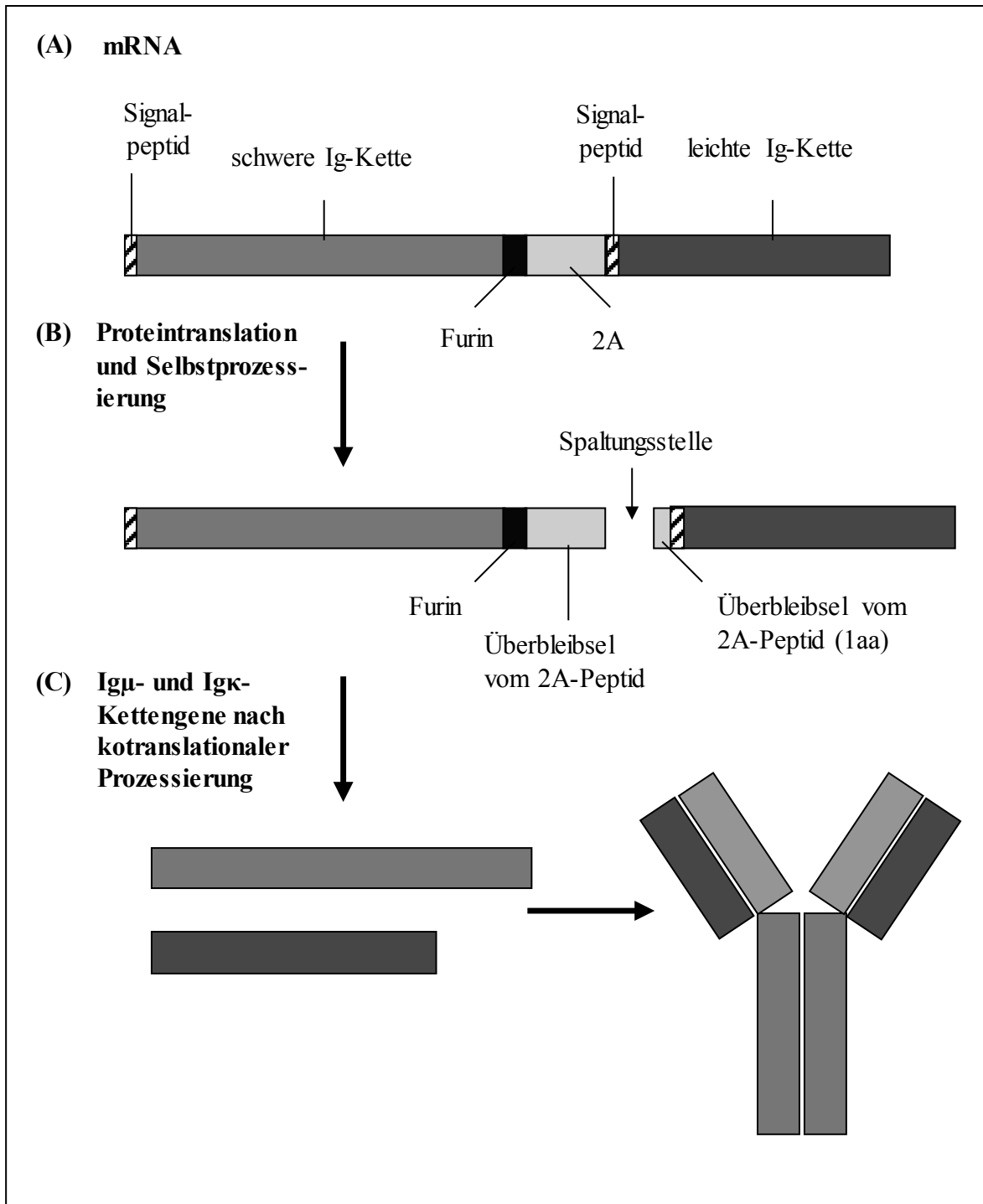


Abb. 6. Schematische Darstellung der rekombinanten MD4 Expressionskassette. (A) Die HEL-spezifischen Ig-Ketten werden durch die beiden selbst-spaltenden (*self cleaving*) Sequenzen Furin und die 2A-Protease miteinander verbunden. Beide Ig-Kettengene besitzen ein Signalpeptid, aber nur die stromabwärts befindliche Igκ-Kette besitzt auch ein Stopp-Codon. (B) Während der Translation kommt es zu einem ersten Spaltereignis an der vom FMDV-Virus abstammenden 2A-Peptidsequenz. Danach verbleibt ein Großteil der 2A-Sequenz am C-Terminus der stromaufwärts gelegenen Igμ-Sequenz. (C) Ein weiteres an der Furin-Protease initiiertes Spaltereignis, liefert schließlich beide Ig-Kettengene ohne weitere Anhängsel. Diese können sich nun zum rekombinanten MD4 BZR zusammenlagern.

3.1.1. Isolierung Antigen-spezifischer B-Zellen aus MD4 BZR-transgenen Mäusen

Als Template für die Klonierung des rekombinanten HEL-spezifischen Ig μ -BZR wurde aus MD4 IgM^{a+} B-Lymphozyten isolierte cDNA verwendet (der a-Allotyp unterscheidet die transgenen von den endogenen BZR; siehe unten). Die transgene MD4-Linie exprimiert HEL-spezifische IgM- und IgD-Rezeptoren auf ihren B-Lymphozyten und wurde in den 1980er Jahren von C.C. Goodnow und Kollegen erzeugt (Goodnow, Crosbie et al. 1988). Dabei diente das Hybridom HyHEL-10, das Antikörper mit einer sehr hohen Affinität für Lysozym sezerniert (Smith-Gill, Lavoie et al. 1984, Smith-Gill, Mainhart et al. 1984, Padlan, Silverton et al. 1989) als Template für die Klonierung des Antigenrezeptors. Bei der Analyse der *Foundertiere* wies die Linie MD4 die stärkste Expression des Transgens auf und wurde daher für nachfolgende Experimente ausgewählt (Goodnow, Crosbie et al. 1988).

Für die Generierung der BZR-retrogenen Mäuse wurden zunächst B-Lymphozyten durch Depletion der CD90-positiven Zellen aus den Milzen MD4 BZR transgener Mäuse mithilfe magnetischer Beads angereichert. Aus dieser CD90-negativen Fraktion wurden schließlich die Antigen-spezifischen B-Lymphozyten unter Verwendung eines Fluorochrom-gekoppelten Allotyp-Antikörpers (anti-IgM^a – FITC; siehe Materialien und Methoden) isoliert. Dies ist möglich, da bei der Generierung der transgenen MD4-Linie die γ 1-konstante Region des HEL-spezifischen Hybridoms HyHEL-10 durch die μ - und δ -Kettengene von BALB/c-Mäusen (IgH^a-Allotyp) ersetzt wurden. Die HEL-spezifischen μ - und δ -Kettengene wurden einer C57BL/6-Maus (IgH^b) koinjiziert. Dies erlaubt die Unterscheidung der endogenen IgH^{b+} B-Zellen von Zellen, die das Transgen exprimieren, da diese IgH^{a+} sind (Goodnow, Crosbie et al. 1988).

In **Abb. 7** sind die einzelnen Phasen der Anreicherung (Einzelzellsuspension direkt nach Isolation, CD90-Depletion mithilfe magnetischer Beads, sortierte IgM^a-positive Zellen) der IgM^{a+} B-Lymphozyten vergleichend gegenübergestellt. Von einer relativ geringen Frequenz an IgM^{a+} Zellen in der unsortierten Probe, konnten nach Sortierung mit dem Allotyp-Antikörper Frequenzen von ~ 98% IgM^{a+} erzielt werden. Aus Zellen mit einer Reinheit von >95% wurde die Gesamt-RNA mittels TRIzol isoliert und für die nachfolgende Klonierung verwendet.

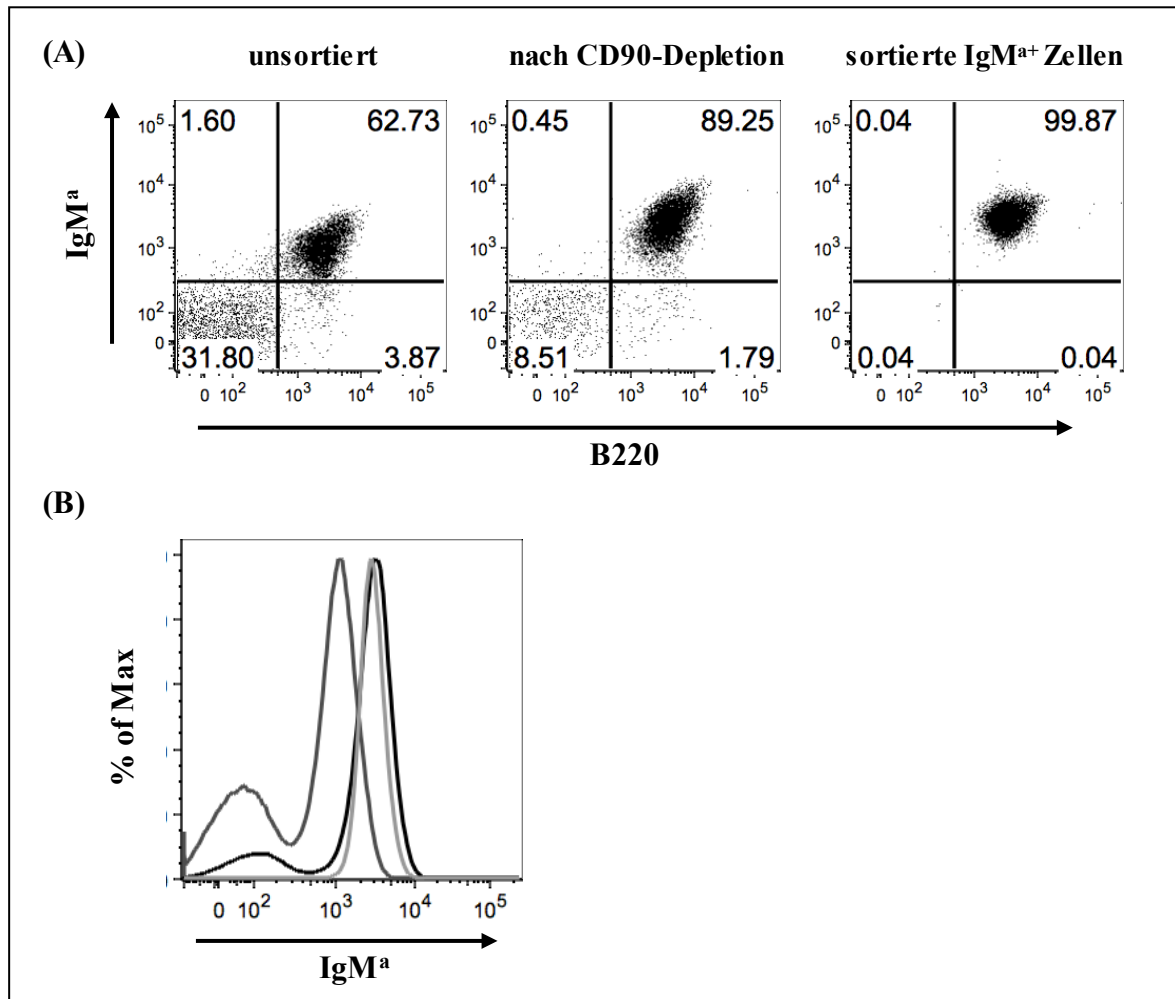


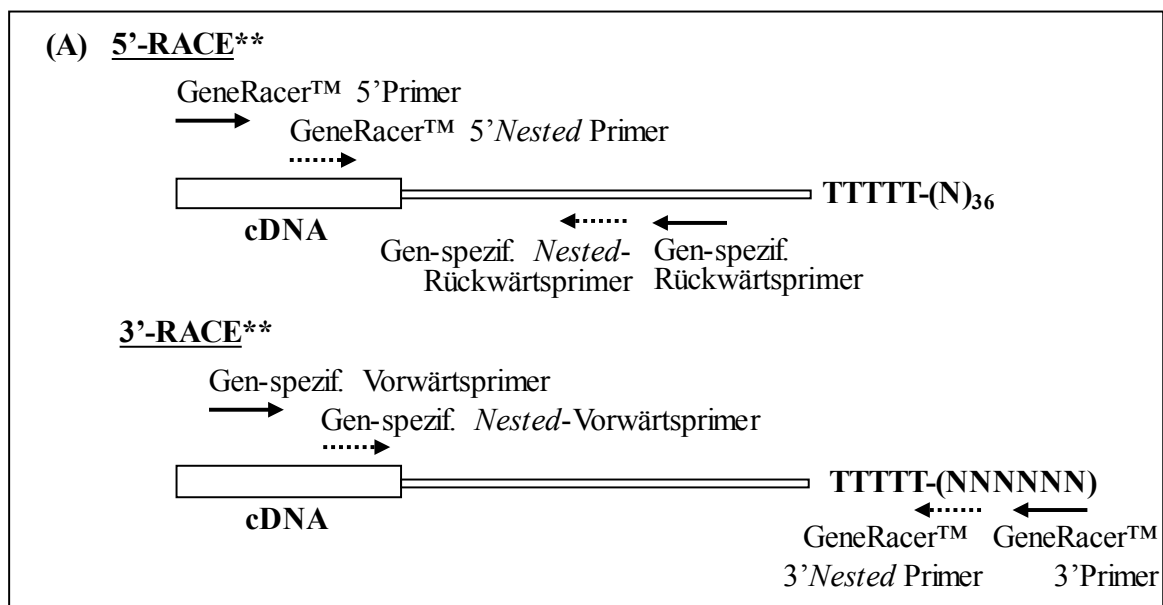
Abb. 7. Isolierung Ag-spezifischer B-Lymphozyten aus MD4-transgenen Splenozyten. Aus einer Milz-Einzelzellsuspension wurden zunächst die B-Lymphozyten durch Depletion der CD90⁺ Zellen angereichert. Diese angereicherten B-Lymphozyten wurden mit einem Fluorochrom-gekoppelten, Allotyp-spezifischen Antikörper (IgM^a) inkubiert und mithilfe des FACSariaII (BD Biosciences) Zellsorters sortiert. Schließlich wurde die Reinheit der sortierten Zellen analysiert und mit unsortierten bzw. CD90-depletierten Zellen verglichen. **(A)** Gezeigt ist die Kontrollfärbung für IgM^a sowie B220. Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. Tote Zellen wurden durch Färbung mit Propidiumiodid (pi) ausgeschlossen. Sortierte Zellen mit einer Reinheit von mehr als 95% wurden zur RNA-Isolation und nachfolgender Klonierung der Ig-Kettengene verwendet. **(B)** Darstellung der Anreicherung der Antigen-spezifischen B-Lymphozyten (IgM^a Zellen) ist in Histogrammen. Dunkelgrau – unsortiert, hellgrau – nach CD90-Depletion, schwarz – sortierte IgM^a Zellen.

3.1.2. 5' und 3'RACE PCR der HEL-spezifischen IgH- und IgL-Ketten zur Erzeugung von *full length* Sequenzinformationen

Die **Abb. 8** zeigt schematisch den Ablauf der mehrstufigen Klonierung des MD4 BZR. Da der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) keine *full length full length*(Nukleotid-)Sequenzeinträge für die HEL-spezifischen Igκ- und Igμ-Kettengene zu entnehmen waren, wurden diese zunächst in 5' und 3'RACE-Reaktionen generiert. Die RACE (*rapid amplification of complementary cDNA ends*) ist eine Form der PCR, bei der ausgehend von der cDNA als Template Sequenzbereiche zwischen einer de-

finierten internen Stelle sowie unbekannten Sequenzen entweder am 5' oder am 3'Ende amplifiziert werden.

Aus den sortierten MD4 B-Lymphozyten wurde die (Gesamt-)RNA isoliert und entsprechend den Angaben der Anleitung des *GeneRacer® Kits* (Life Technologies) für die 5' und 3'RACE-Reaktionen vorbereitet (Dephosphorylierung und *Decapping* für 5'-RACE, Ligation des RNA-Oligos für 5' und 3'RACE) und revers transkribiert. Für die 5'RACE wurde die erhaltene cDNA unter Verwendung des *GeneRacer* 5'Primer sowie eines Gen-spezifischen Primers (sowohl für die HEL-spezifische IgH- als auch IgL-Kette) in die PCR eingesetzt. Für die 3'-RACE wurde die cDNA gemeinsam mit dem *GeneRacer* 3'Primer und ebenfalls eines Gen-spezifischen Primers (wiederum für die HEL-spezifische IgH- und IgL-Kette) in die PCR eingesetzt. In **Abb. 9** ist das Ergebnis der Gelelektrophorese der 5', der 5'*Nested* sowie der 3'RACE für beide Ig-Kettengene gezeigt. Die Amplifikate nach 5' und nach 5'*Nested* RACE wiesen eine Länge von <500 bp (beide), die nach 3'RACE von ~ 100 bp (für Igκ) bzw. 350 bp (für IgH) auf. Die für beide Ig-Ketten nach 5'*Nested*- und nach 3'RACE erhaltenen PCR-Produkte wurden in pCR4 TOPO kloniert. In **Abbildung A1** und **A2** im Anhang sind die Ergebnisse vom Screening der Transformanten gezeigt (Gelelektrophorese nach Kontroll-PCR sowie nach Test-Restriktionsverdau). Von ausgewählten Klonen wurde die Sequenz analysiert (AGOWA/LGC GENOMICS, Berlin). Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden schließlich *in silico* zu *full length* Sequenzen zusammengefügt (siehe **Abb. A3** und **A4** im Anhang).



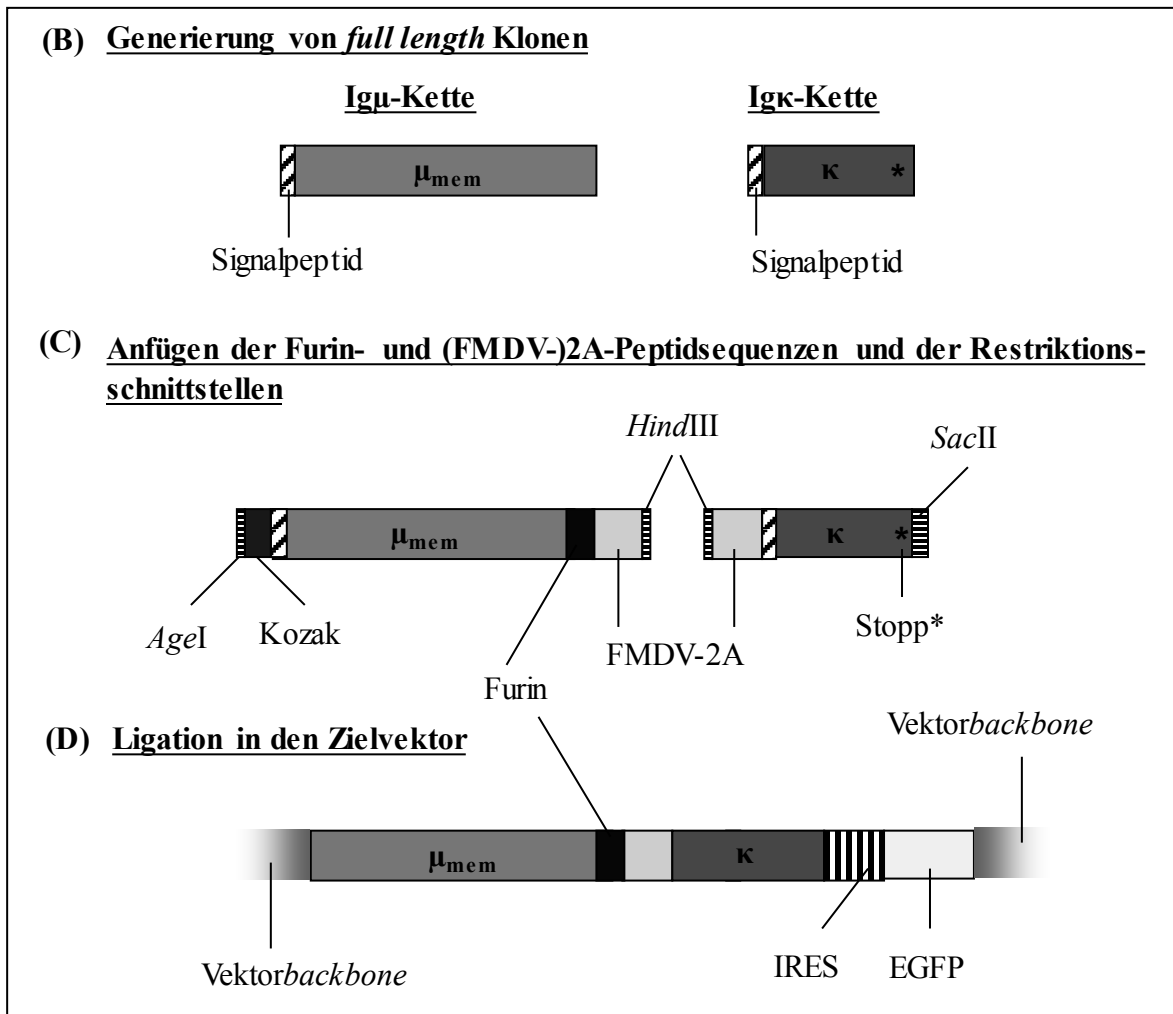


Abb. 8. Klonierungsstrategie des rekombinanten MD4 B-Zell-Rezeptors. (A) Zunächst wurden mithilfe von 5' und 3'RACE PCR-Reaktionen Sequenzinformationen für die HEL-spezifische Ig μ_{mem} - und Ig κ -Kette generiert, und diese *in silico* zu *full length* Sequenzen für beide Ig-Ketten zusammengefügt. (B) Basierend auf diesen Sequenzen wurden Primer für die *full length* Klonierung der Ig μ - und der Ig κ -Kette designiert. Die *full length* Klone wurden aus erneut isolierter cDNA generiert. (C) Im nächsten Klonierungsschritt wurden mithilfe neu designierter Primer Restriktionsschnittstellen (5'*AgeI* bzw. 3'*SacII*) sowie an das 3'Ende der Ig μ_{mem} -Kette das Furin und hälftig das FMDV-2A-Peptid angefügt; die zugehörige andere Hälfte des FMDV-2A-Peptids wurde an das 5'Ende der Ig κ -Kette angehängt. In das 2A-Peptid wurde eine *HindIII*-Schnittstelle eingefügt. Entsprechende Klone wurden aus erneut isolierter cDNA und unter Verwendung der eben beschriebenen Primer generiert. (D) Die Ligation in den retroviralen Zielvektor über die Schnittstellen *AgeI*, *HindIII*, *SacII* lieferte den rekombinanten BZR. Die Sequenz ausgewählter Klone wurde wiederum überprüft. Ein rekombinanter Klon wurde für alle weiteren Experimente verwendet. In allen Phasen der Klonierung wurde die Sequenz ausgewählter Klone analysiert. Abbildung modifiziert nach *GeneRacer® Manual* (LIFE TECHNOLOGIES; Version L; Stand April 2004) und eigene Darstellung. (* Das Stopp-Codon am 3'Ende der Ig κ -Kette ist mit einem Stern gekennzeichnet; das 3'Ende der Ig μ -Kette beinhaltet kein Stopp-Codon. ** Die Darstellung für die 5' und 3'RACE erfolgt für beide Ketten schematisch nur einmal.)

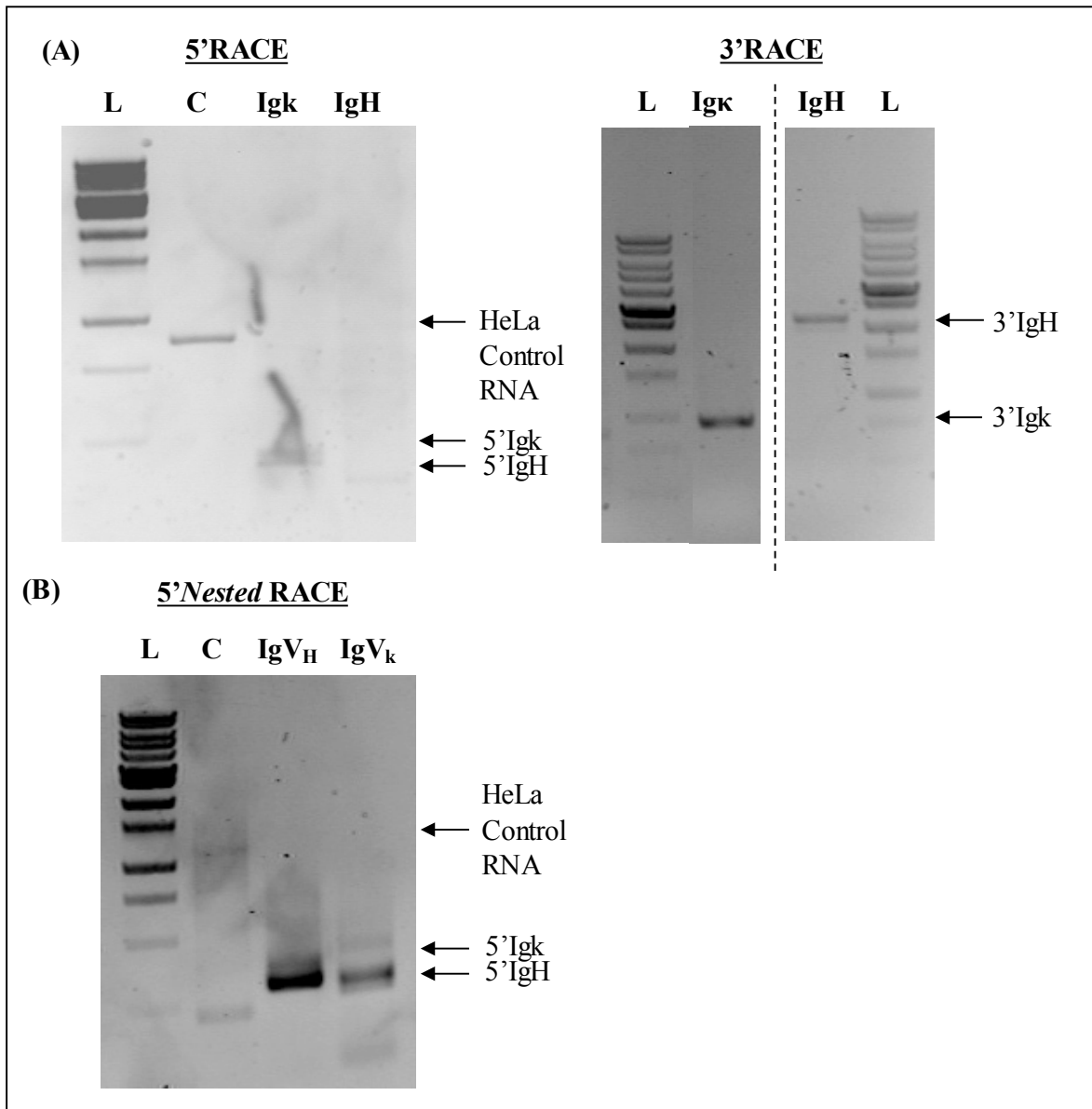


Abb. 9. 5'(*Nested*)- und 3'RACE PCR-Reaktionen zur Generierung von *full length* Sequenzinformationen für die Lysozym-spezifischen Ig-Ketten. (A) Die aus den sortierten IgM^{a+} Zellen isolierte RNA wurde nach Herstellerangaben des *GeneRacer® Kit™* (LIFE TECHNOLOGIES) für die 5' bzw. 3'RACE vorbereitet, revers transkribiert und anschließend in die 5' bzw. 3'RACE eingesetzt. Es wurde die *FideliTaq* (USB/AFFYMETRIX) verwendet. Es wurden je 4 µl Template eingesetzt; die *Annealing*temperaturen betrugen 61°C (HeLa), 59°C (Igκ) und 56°C (IgH); die *Elongation* erfolgte bei 68°C. Gezeigt ist das Ergebnis nach Gelelektrophorese (1% Agarosegel). (B) Die nach 5'RACE erhaltenen Fragmente wurden mithilfe des *Zyppy DNA Clean & Concentrator Kits* (ZYMORESEARCH) aufgereinigt und in einer 5'Nested-RACE PCR (zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität der PCR-Produkte) als Template eingesetzt. Für diese 5'Nested-PCR wurde jeweils der mitgelieferte 5'Nested Primer verwendet sowie für die HeLa-Kontroll-PCR der ebenfalls mitgelieferte Kontroll-Primer A; für die Igκ-Kette der Primer JF_45 bzw. für die IgH-Kette der Primer JF_37. Die *Annealing*temperaturen betrugen 65°C (HeLa), 61°C Igκ bzw. 57°C für IgH. Die erhaltenen Produkte wurden aus dem Gel aufgereinigt und in den TOPO TA Vektor pCR4® (LIFE TECHNOLOGIES) ligiert. Von ausgewählten Klonen wurde die Sequenz analysiert (AGOWA/LGC GENOMICS, Berlin).

3.1.3. Generierung von *full length* Klonen für die MD4-spezifische Ig μ _{mem}- und Ig κ -Kette

Basierend auf den *in silico* generierten *full length* Sequenzinformationen wurden sowohl für die MD4-spezifische Ig κ - und Ig μ -Kette neue Primer entworfen. Entsprechende *full length* Klone wurden nun aus erneut isolierter IgM^{a+} cDNA generiert (siehe auch schematische Darstellung der Klonierung in **Abb. 8**). In **Abb. 10** wird das Ergebnis der Gelelektrophorese für die *full length* MD4-spezifische Ig μ - und Ig κ -Kette gezeigt. Dabei ist für die *full length* Ig μ _{mem}-Kette ein Fragment von ~ 1750 bp und für die Ig κ -Kette von ~ 650 bp zu erwarten. Für die *full length* Ig μ _{mem}-Kette wurde eine zweite Bande und somit ein Nebenprodukt in der PCR erhalten. Für die weitere Klonierung wurde daher das PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von ~ 1750 bp aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des *Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System Kit* (PROMEGA) aufgereinigt und in den TOPO TA Vektor pCR®II (LIFE TECHNOLOGIES) ligiert. Das für die MD4-spezifische Ig κ -Kette erhaltene PCR-Produkt wurde identisch behandelt. Die für beide Ig-Ketten erhaltenen Transformanten wurden in PCRs, in denen Bereiche der IgV_H- bzw. IgV_L-Ketten spezifisch amplifiziert wurden, sowie im Restriktionsverdau (*EcoRI*) auf das Vorhandensein des jeweiligen Inserts überprüft; die Ergebnisse werden in **Abbildung A5** und **A6** im Anhang gezeigt. Von ausgewählten Klonen für beide Ketten des Antigenrezeptors wurde wiederum die Nukleotidsequenz analysiert.

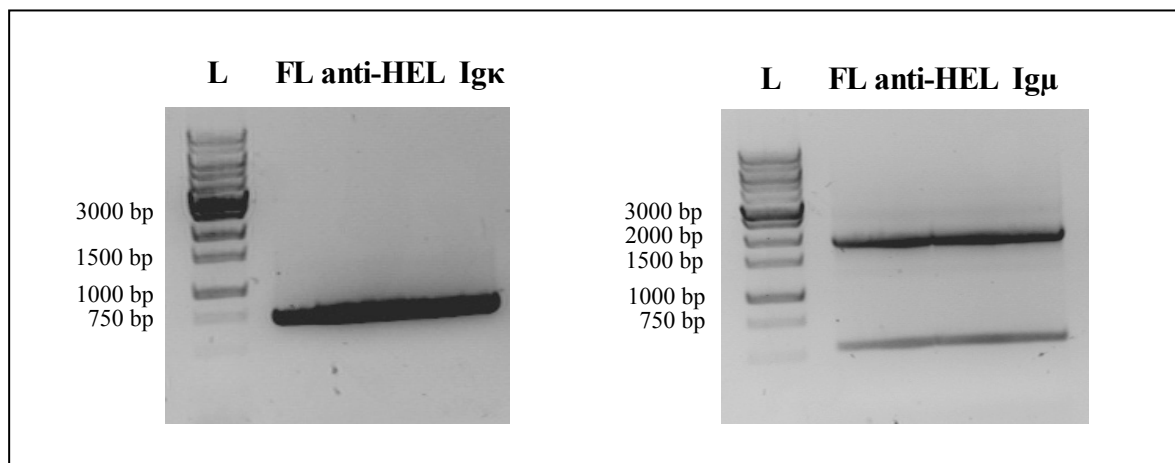
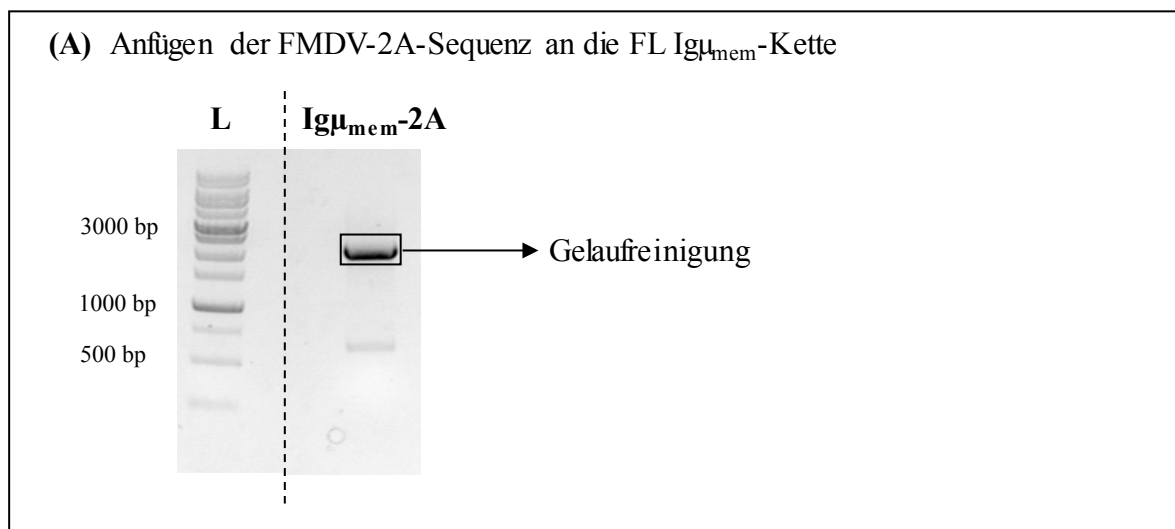


Abb. 10. Generierung von *full length* Klonen für die MD4-spezifische Ig κ - und Ig μ _{mem}- Kette. Die aus den sortierten IgM^{a+} Zellen isolierte RNA wurde mit Oligo(dT) in cDNA umgeschrieben und anschließend unter Verwendung der Primer 5'JF_48 und 3'JF_49 für FL Ig κ ($T_{\text{Anneal}} = 54^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{Elong}} = 1 \text{ min}$; ~ 650 bp) sowie 5'JF_50 und 3'JF_51 für *full length* Ig μ _{mem} ($T_{\text{Anneal}} = 54^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{Elong}} = 2 \text{ min}$; ~ 1750 bp) in die PCR eingesetzt. Es wurde die *High Fidelity Polymerase* (ROCHE) verwendet. Gezeigt ist das Ergebnis nach Gelelektrophorese (1% Agarosegel). Die erhaltenen Produkte wurden mithilfe des *Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System Kit* (PROMEGA) aus dem Gel aufgereinigt und in den TOPO TA Vektor pCR®II ligiert. Von ausgewählten Klonen wurde die Sequenz analysiert (AGOWA/LGC GENOMICS, Berlin).

3.1.4. Anfügen der *self-cleaving* 2A-Peptidsequenz und von Restriktionsschnittstellen an die *full length* MD4 Ig μ_{mem} - und Ig κ -Klone

Im nächsten Klonierungsschritt sollten an die Ig κ - und Ig μ -Sequenzen die 2A-Proteasesequenz sowie Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen angefügt werden. Der detaillierte Aufbau der Expressionskassette (5'UTR – HEL-Ig μ_{mem} – Furin – 2A Protease – HEL-Ig κ – IRES – eGFP – 3'UTR) ist in **Abb. 8** schematisch gezeigt. Zur Verknüpfung der beiden HEL-spezifischen Ig-Kettensequenzen wurde die vom *Foot-and-Mouth-Disease-Virus*-(FMDV-)stammende 2A-Proteasesequenz (APVKQTLNFDLLKLAGD-VESNPGP) verwendet, da für diese *cleavage*-Effizienzen von >90% beschrieben sind (Ryan, King et al. 1991, Ryan and Drew 1994, de Felipe, Hughes et al. 2003). Stromaufwärts der FMDV-2A-Proteasesequenz wurde außerdem eine endogene Furin-Schnittstelle (siehe auch Abschnitt 3.2.) eingefügt. Sie bewirkt, dass die HEL-spezifische Ig μ_{mem} -Kette nach der Translation ohne weitere Sequenzanhängsel an ihrem 3'Ende (bzw. C-Terminus auf Proteinebene) vorliegt. Für das Anfügen der Restriktionsschnittstellen sowie der 2A-Protease- und der Furinsequenz wurden neue Primer designt. In einer PCR, in der wiederum aus IgM^{a+} B-Lymphozyten isolierte cDNA als Template diente, wurden diese Sequenzen angefügt. **Abbildung 11** zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese nach PCR. Die PCR-Produkte wiesen Größen von ~ 1800 bp für die Ig μ_{mem} - und von ~ 780 bp für Ig κ -Kette auf. Die jeweiligen Banden wurden – wie in den Klonierungsschritten zuvor – aus dem Gel aufgereinigt, in pCR®II TOPO kloniert und in kompetente *E.coli* transformiert. Die Transformanten wurden wiederum mittels PCR und Restriktionsverdau überprüft (siehe **Abbildung A7** und **A8** im Anhang) und schließlich die Sequenz ausgewählter Klone analysiert.



(B) Anfügen der FMDV-2A-Sequenz an die FL Igκ-Kette

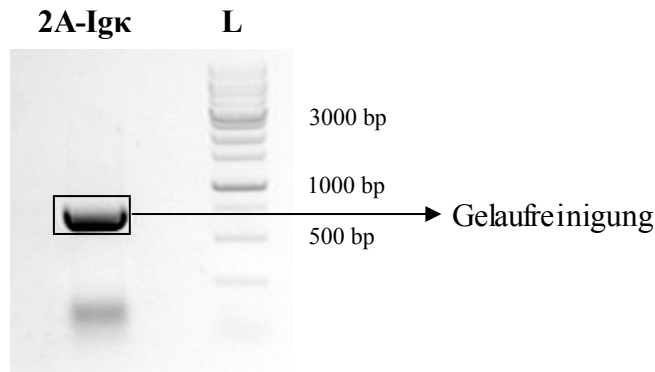


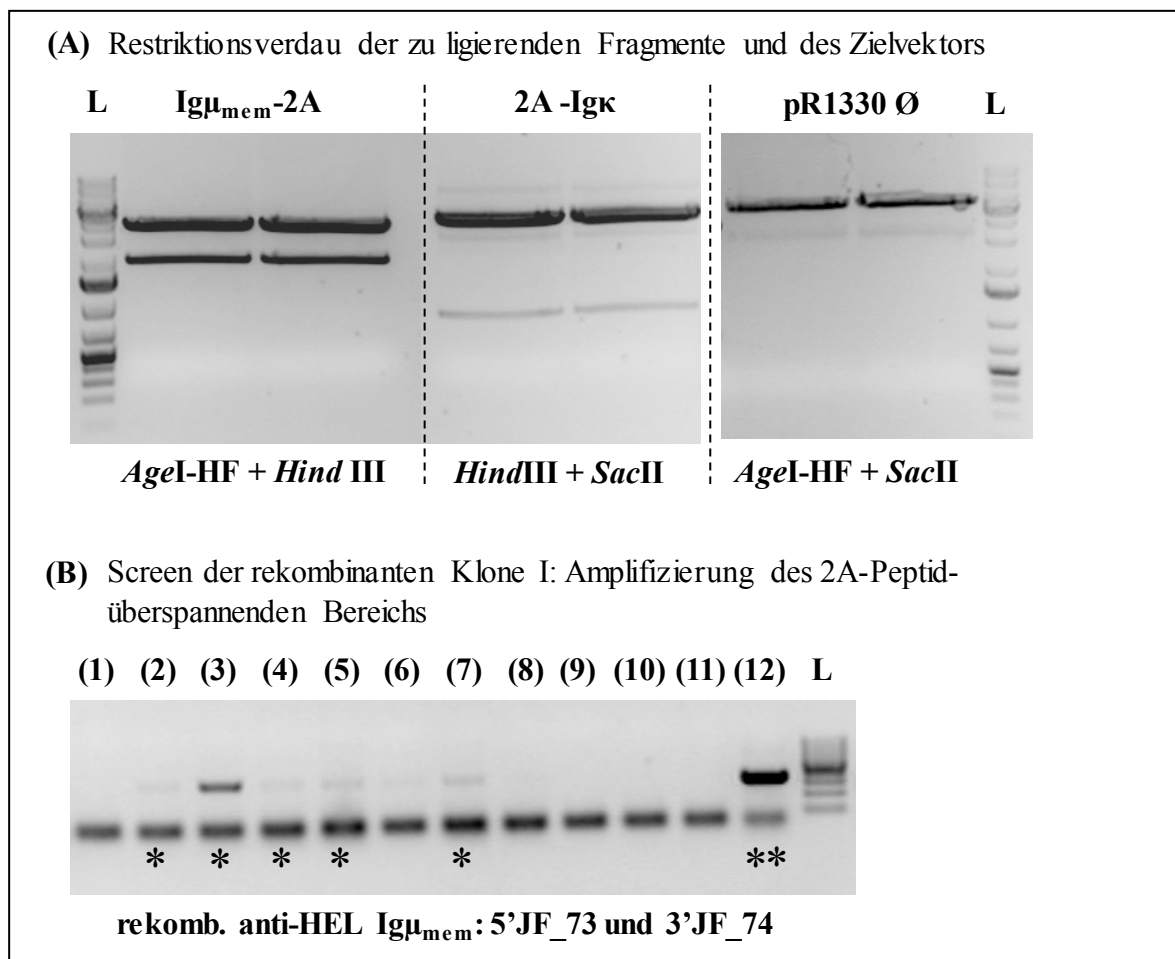
Abb. 11. Anfügen der 2A-Peptidsequenz an die *full length* Sequenzen der Igκ- und Igμ_{mem}-Klone. Als Template diente cDNA von IgM⁺ sortierten MD4 B-Lymphozyten. **(A)** Für das Anfügen der FMDV-2A-Sequenz an die HEL-spezifische Igμ_{mem}-Kette wurden die Primer 5'JF_66 und 3'JF_67 verwendet (je 0,5 μl; T_{Anneal} = 65°C; t_{Elong} = 2 min; 1800 bp). Dargestellt ist das Ergebnis nach erfolgter Gelelektrophorese (1% Agarose). Die Bande mit erwarteter Größe wurde aus dem Gel aufgereinigt (*Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System Kit*; PROMEGA). **(B)** Für das Anfügen der FMDV-2A-Sequenz an die HEL-spezifische Igκ-Kette wurden die Primer 5'JF_68 und 3'JF_69 (T_{Anneal} = 61°C; t_{Elong} = 45 sek; t_{inkr} = 5 sek/Zyklus; ~ 780 bp) verwendet. Dargestellt ist das Ergebnis nach erfolgter Gelelektrophorese (1% Agarose). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden, gemeinsam mit den aufgereinigten PCR-Produkten für die Igμ_{mem}-Kette, in je eine TOPO TA Klonierung in pCR®II (LIFE TECHNOLOGIES) eingesetzt. Von ausgewählten Klonen wurde die Sequenz analysiert (AGOWA/LGC GENOMICS, Berlin).

3.1.5. Generierung des rekombinanten MD4 BZR_s und Ligation in den retroviralen Zielvektor

Das rekombinante Konstrukt wurde schließlich unter Verwendung der eingeführten Restriktionsschnittstellen aus beiden Ig-Kettengenen in den retroviralen Zielvektor, pR1330, ligiert. Das Vektorbackbone des pR1330 ist ein rekombinanter Virus (*Myeloproliferative sarcoma virus*, MPSV), der aus dem murinen Leukämievirus (*Moloney murine leukemia virus*, MLV) gewonnen wurde. Das MLV gehört zur Familie der *Retroviridae*, [Gattung Gammaretrovirus], und besitzt ein positiv geladenes RNA-Genom. Die Verwendung des MPSV-LTRs (*Long terminal Repeat*) resultiert – verglichen mit dem *Moloney* LTR – in einer verbesserten Expression in hämatopoietischen Zellen. Weiterhin wurde das Ausgangsvirus so modifiziert, dass es in embryonalen Stammzellen nicht ausgeschaltet (*silenced*) wird (*murine embryonic stem cell virus*, MESV; persönlicher Kommentar C. Stocking Harbers, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg). Stromabwärts der *multiple cloning site* (*mcs*) befindet sich ein IRES-eGFP-Element, wobei das eGFP die Detektion sowohl transfizierter als auch transduzierter Zielzellen erlaubt.

Unter Verwendung der mittels PCR angefügten Restriktionsschnittstellen (*AgeI*, *HindIII* und *SacII*) wurden die beiden *Inserts* und der retrovirale Zielvektor mit den angegebenen

Restriktionsendonukleasen verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis wird in **Abb. 12A** gezeigt. Die Banden für den linearisierten Vektor und die beiden *Inserts* (herausgetrennt aus dem pCR®II Plasmid) wurden aus dem Gel aufgereinigt und in die Ligation eingesetzt. Die nach Transformation erhaltenen Klone wurden in mehreren PCR-Reaktionen analysiert. In der ersten Screening-PCR wurde spezifisch ein das 2A-Peptid überspannender Bereich, beginnend vom 3'Ende der Ig μ_{mem} -Kette über das 2A-Peptid bis zum 5'Ende der Ig κ -Kette, amplifiziert. Das Ergebnis nach der Gelelektrophorese ist in **Abb. 12B** dargestellt. Ein PCR-Produkt ist nur zu erwarten wenn die beiden Ig-Ketten korrekt in den Zielvektor ligiert sind. Klone, die in dieser PCR ein spezifisches Produkt ergeben haben, wurden in zwei weiteren PCR-Reaktionen überprüft. Dabei wurden Bereiche innerhalb der IgH- und IgL-Kette amplifiziert (**Abb. 12C**). Schließlich wurde die Nukleotidsequenz eines ausgewählten rekombinanten Klons analysiert. Da dieser Klon (Klon 4.I.12) – verglichen mit der *in silico* generierten Sequenz – in seiner Sequenz keine Aminosäureaustausche trägt, wurde für alle weiteren Experimente ausgewählt. Die Sequenz ist in **Abbildung A9** im Anhang gezeigt.



(C) Screen der rekombinanten Klone II: Amplifizierung der Igκ- und IgH-Bereiche

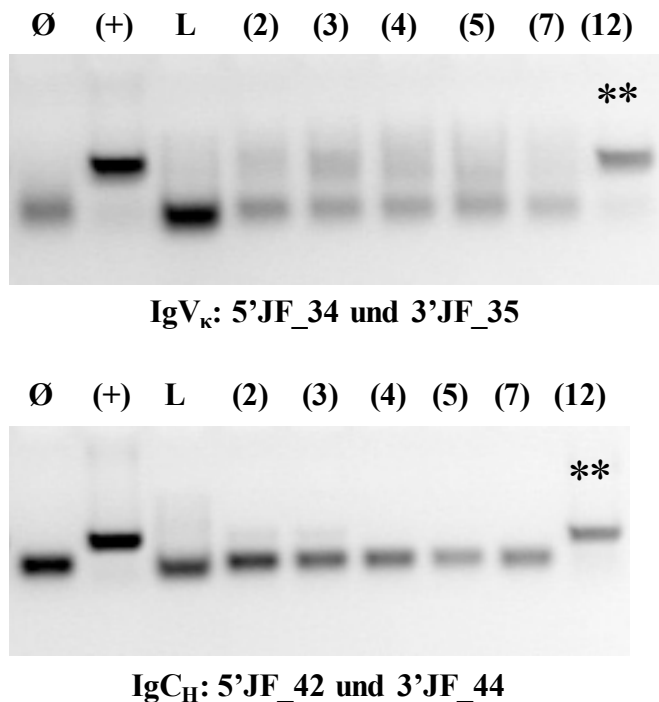


Abb. 12. Generierung des rekombinanten MD4 BZR_s. (A) Die in die Ligation einzusetzenden Fragmente wurden entsprechend der angefügten Restriktionsschnittstellen verdaut und anschließend aus dem Gel mithilfe des *Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System Kit* (PROMEGA) aufgereinigt. Für die Ligation wurden die Fragmente im Verhältnis 2:2:1 unter Verwendung der T4 DNA Ligase (NEW ENGLAND BIOLABS) eingesetzt. (B) Nach erfolgreicher Transformation in kompetente *E.coli* DH5α wurden die rekombinanten Klone in einer PCR überprüft. Dabei wurde ein das 2A-Peptid überspannender Bereich amplifiziert (5'JF_73 und 3'JF_74; T_{Anneal} = 57°C; t_{Elong} = 30 sek; 380 bp); ein PCR-Produkt ist nur zu erwarten, wenn die beiden Ig-Ketten korrekt in den Zielvektor ligiert sind. (C) Klone, die in dieser PCR ein spezifisches Produkt ergeben haben (markiert mit „**“), wurden zur Überprüfung in zwei weitere PCRs eingesetzt, um Bereiche der IgV_κ- (5'JF_34 und 3'JF_35; T_{Anneal} = 58°C; t_{Elong} = 30 sek; ~ 250 bp) und der IgC_H-Kette (5'JF_42 und 3'JF_44; T_{Anneal} = 60°C; t_{Elong} = 45 sek; ~ 400 bp) zu amplifizieren. In (B) und (C) ist das Ergebnis nach Gelelektrophorese gezeigt (2% Agarosegel); es wurde die *Gene Ruler Low Range DNA Ladder* (FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC) verwendet. Als Positivkontrollen (+) diente DNA, der in die Ligation eingesetzten Klone für die HEL-spezifische Igu- und Igκ-Kette; dH₂O wurde als Negativkontrolle verwendet. Der mit ** markierte Klon Nr.12 wurde für die Sequenzierung ausgewählt.

3.2. *In vitro* Nachweis der vom FMDV-2A-Peptid vermittelten Spaltung

Die vom 2A-Peptid vermittelte Spaltung erfolgt während des Translationsprozesses. Die Spaltung erfolgt zwischen den beiden letzten Aminosäuren der 2A-Sequenz, dem Glyzin und dem Prolin (APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPG – P). Nach der Spaltung verbleibt ein Teil des 2A-Peptids (APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPG) als Anhängsel an der stromaufwärts gelegenen Proteinsequenz. Es ist nicht auszuschließen, dass diese zusätzliche Sequenz Auswirkungen auf die Funktion des stromaufwärts gelegenen Proteins hat. Bislang sind jedoch keine negativen Auswirkungen bekannt (Holst, Vignali et al. 2006,

Bettini, Bettini et al. 2012). Im Falle des retrogenen MD4 BZR_s verbleibt das 2A-Peptid nach der Spaltung am C-Terminus der Ig μ -Kette.

Da B-Zell-Rezeptoren nur auf der Zelloberfläche exprimiert werden, wenn die Sequenz ihres C-Terminus korrekt ist (und auch nur dann eine Signalweiterleitung erfolgen kann), wurde stromaufwärts der FMDV-2A-Peptidsequenz eine sog. Furin-Spaltstelle (RRRR) eingefügt. Dies bewirkt ein zweites Spaltungsereignis (in der zeitlichen Abfolge nach der durch das FMDV-2A-Peptid-vermittelten Spaltung) und resultiert in einer natürlicheren Ig μ -Kette ohne weitere Sequenzanhängsel (siehe **Abb. 6**). Die Spaltung erfolgt an der Konsensussequenz Arg-X-Lys/Arg-Arg (van de Ven, Voorberg et al. 1990, Nakayama 1997, Thomas 2002).

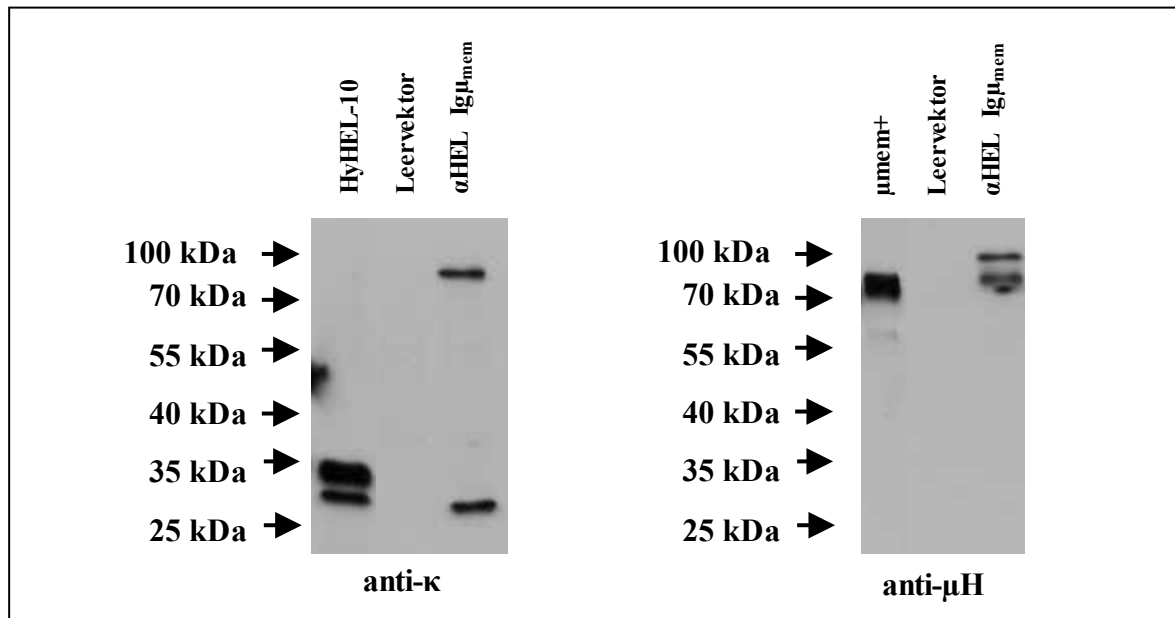


Abb. 13. Verifizierung der vom 2A-Peptid-vermittelten Spaltung in CHO-K1 Zellen. *Chinese hamster ovary*-K1 Zellen (CHO-K1 Zellen) wurden mit Leervektor- bzw. Plasmid-DNA für den rekombinanten HEL-Ig μ _{mem} BZR transfiziert (*Lipofectamine*® 2000, LIFE TECHNOLOGIES). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und im Western Blot analysiert. Als Kontrollen dienten Lysate von Zelllinien, die leichte oder schwere Ig-Ketten exprimieren. Nach Inkubation der Membranen mit μ H- bzw. κ -spezifischen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die Ig-Ketten ausschließlich in den Lysaten der mit dem rekombinanten HEL-Ig μ _{mem} BZR transfizierten Zellen exprimiert werden. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

Um zu überprüfen, mit welcher Effizienz die beiden Spaltungsereignisse erfolgen, wurden CHO-K1 Zellen (*chinese hamster ovary*) mit dem retroviralen / für den rekombinanten Ig μ _{mem}-kodierenden Konstrukt transfiziert und die Lysate im Western Blot analysiert (**Abb. 13**). Lysate von entweder mit dem Leervektor transfizierten Zellen oder von Hybridomen, die Ig μ - und Ig κ -Ketten exprimieren, dienten als Kontrollen (Smith-Gill, Lavoie et al. 1984, Smith-Gill, Mainhart et al. 1984). Nach Inkubation mit anti-Maus μ H- und Ig κ -

spezifischen Antikörpern, konnten Banden mit einem Molekulargewicht von ~ 28 kDa für die Ig κ -Kette und von ~ 70 kDa für die μ H-Kette detektiert werden. Dies lässt eine Spaltung des rekombinanten Konstruktes durch das 2A-Peptid oder/und das Furin vermuten. Es konnte sowohl im μ H- als auch im Ig κ -spezifischen Blot jeweils eine zweite Bande mit einem Molekulargewicht von ~ 100 kDa detektiert werden. Dies deutet möglicherweise auf eine unvollständige Spaltung hin. Da jedoch die Intensitäten der μ H- und der Ig κ -spezifischen Banden mit der des ungespaltenen Produktes vergleichbar waren, kann angenommen werden, dass gespaltenes und ungespaltenes Protein in nahezu gleichen Mengen vorlagen. Daher wurde die Oberflächenexpression des rekombinanten α -HEL Ig μ_{mem} -BZR *in vitro* untersucht (**Abschnitt 3.4**).

3.3. Generierung von *Producerzellen* und Austestung der virushaltigen Überstände durch Infektion von NIH/3T3-Zellen

Für die Erzeugung von virushaltigen Überständen wurden die durch Modifizierung aus HEK293T-Zellen generierten PhoenixEco-Zellen verwendet. Die Transfektion dieser Zellen mit dem retroviralen Zielplasmid erlaubt die schnelle Generierung retroviraler Partikel, die schließlich für die Infektion von sich teilenden Zellen verwendet werden können. Die hier verwendeten PhoenixEco-Zellen produzieren ecotrophe Viren, die ausschließlich in murine Zielzellen integrieren können [<http://www.stanford.edu/group/nolan/index.html>].

Die Transfektion der PhoenixEco-Zellen mit dem retroviralen Zielplasmid erfolgte durch Calciumphosphatpräzipitate (Calciumphosphat-Transfektion, CaP). Die virushaltigen Überstände wurden 48 h nach Transfektion sterilfiltriert, um eventuell enthaltene Zellen zu entfernen, und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die im retroviralen Plasmid enthaltene IRES-eGFP *Site* erlaubt die Detektion transfizierter Zellen am Durchflusszytometer (durch ein Signal im FITC-Kanal) und somit die Bestimmung der Transfektionseffizienz (als % eGFP $^{+}$ Zellen). Das Ergebnis einer Calciumphosphat-Transfektion der PhoenixEco-Zellen ist exemplarisch in **Abbildung 14A** gezeigt. Als Kontrollen dienten in allen Versuchen MOCK-transfizierte sowie mit dem retroviralen Leervektor (pR1330 \emptyset) transfizierte Ansätze. Die Transfektionseffizienz betrug im Schnitt zwischen 45 und 75%.

Von jeder durchgeführten Transfektion wurde ein Aliquot des generierten virushaltigen Überstandes für eine Testinfektion verwendet. Dazu wurden NIH/3T3-Zellen durch Zentrifugation (3,5 h bei 33°C und 3300 rpm) mit den zu testenden Überständen in Anwesenheit von Polybren, einer Substanz die die Aufnahme der Viruspartikel verbessert, infiziert. Nach 24 h wurde der Erfolg der Infektion durchflusszytometrisch ermittelt (% eGFP $^{+}$ Zel-

len). Das Ergebnis einer Testinfektion ist in **Abbildung 14B** dargestellt. Für die Infektion der BZR-defizienten Zelllinie sowie der Knochenmarkszellen der Donor-Mäuse wurden ausschließlich virushaltige Überstände verwendet, für die in der Testinfektion eine Infektionsrate von mindestens 45% ermittelt werden konnte.

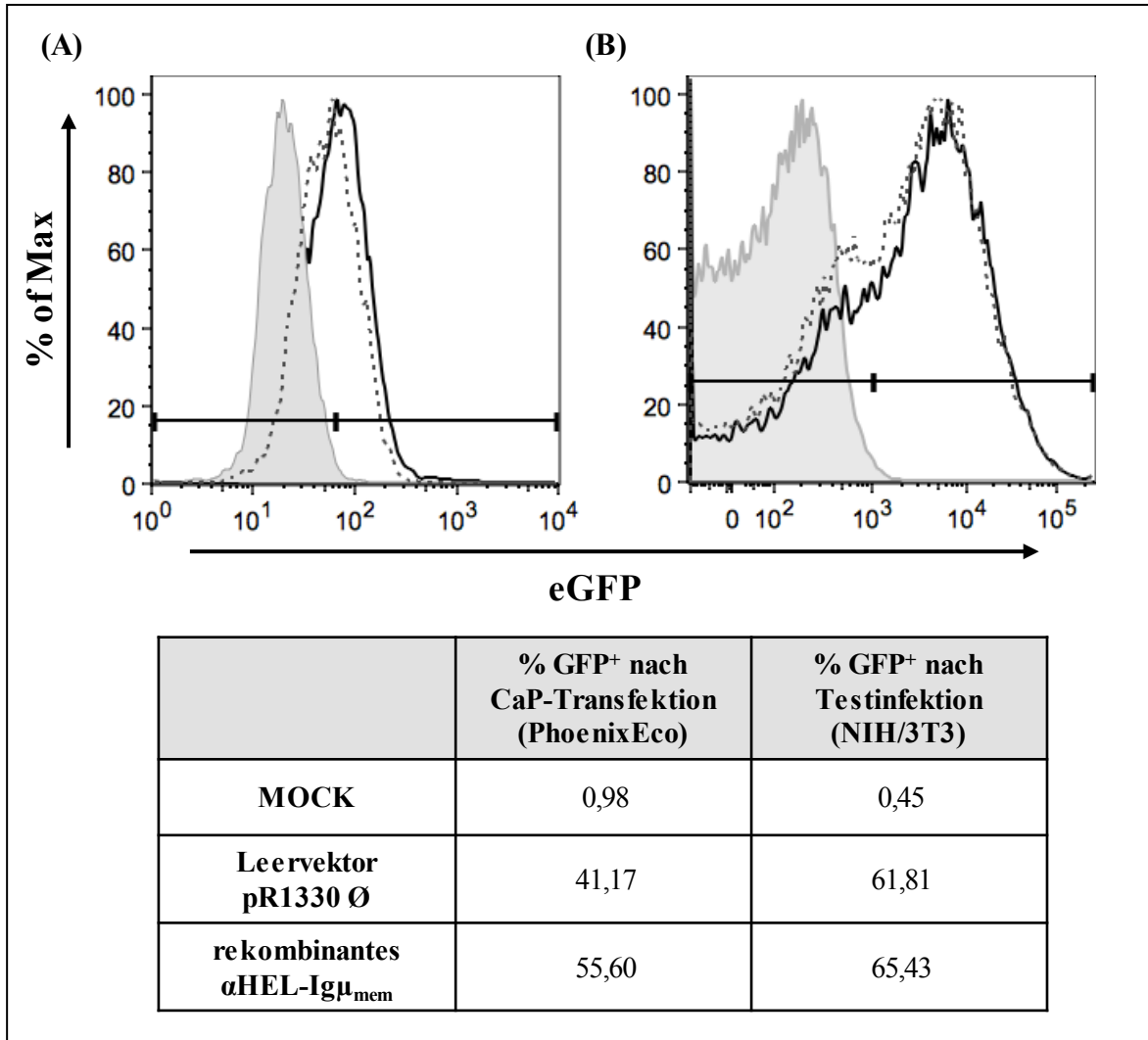


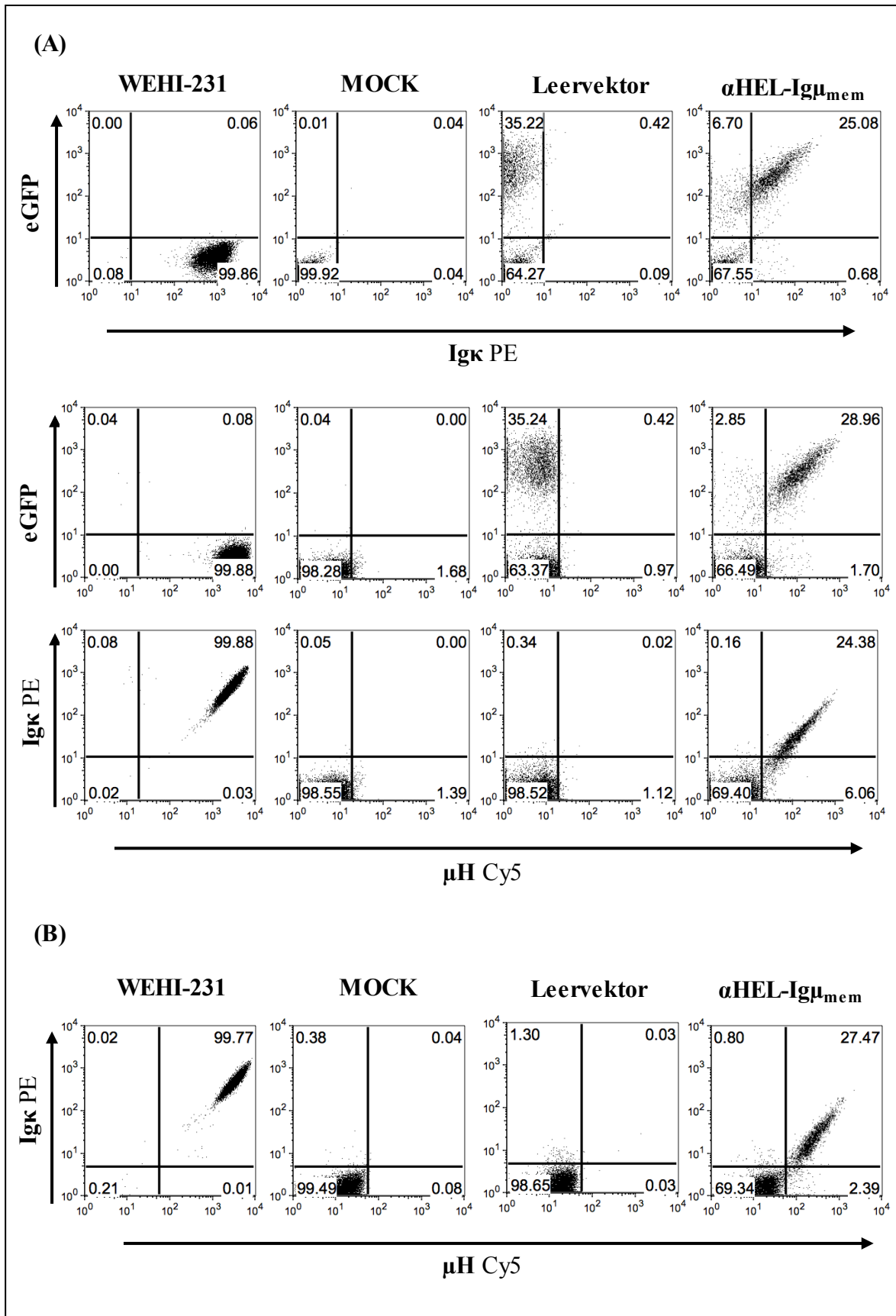
Abb. 14. Generierung von virushaltigen Überständen. PhoenixEco-Zellen wurden mit Leervektor- bzw. Plasmid-DNA für den rekombinanten HEL-Igμ_{mem} BZR transfiziert und nach 48 h die Transfektionsrate am Durchflusszytometer ermittelt; die virushaltigen Überstände wurden sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung gelagert. **(A)** Dargestellt ist das Ergebnis einer Calciumphosphat-Transfektion der PhoenixEco-Zellen. Grau – untransfiziert, gestrichelt – Leervektor, schwarz – αHEL Igμ_{mem}. **(B)** Die generierten Virusüberstände wurden in eine Testinfektion mit NIH/3T3-Zellen eingesetzt und nach 24 h die Transduktionsrate durchflusszytometrisch bestimmt. Für die Infektion der Spenderzellen wurden Virusüberstände mit einer Transduktionsrate von mindestens 45% verwendet.

3.4. Expression des rekombinanten MD4-BZRs in einer BZR-defizienten Zelllinie

Zum Nachweis der Expression des rekombinanten MD4 BZRs *in vitro*, wurde die IL-7-abhängige Pro-B-Zelllinie R5B (*rag2*^{-/-}) mit virushaltigen Überständen infiziert. Diese Zelllinie besitzt keine endogene μH-Kette, exprimiert jedoch die *surrogate* leichte Kette (*surrogate light chain*) (Corfe, Gray et al. 2007, Milne, Corfe et al. 2008). Somit kann ei-

nerseits die Konkurrenz mit endogenen Ig μ -Ketten ausgeschlossen werden und gleichzeitig stammen alle in den transduzierten R5B-Zellen detektierten Ig μ -Ketten vom retrogenen MD4 BZR. Die verwendeten Überstände wurden durch Transfektion der PhoenixEco-Zellen generiert (siehe Materialien und Methoden). Überstände von Leervektor- als auch MOCK-transfizierten Zellen sowie die Ig μ -exprimierende WEHI-231-Zelllinie dienten als Kontrollen (Boyd and Schrader 1981). Der MOCK-transfizierte Ansatz diente als Negativkontrolle; der mit dem Leervektor-transfizierte Ansatz als Positivkontrolle für eGFP (jedoch gleichzeitig negativ für Ig μ und Ig κ); die WEHI-231-Zelllinie als Positivkontrolle, da sie sowohl Ig μ - als auch Ig κ -Ketten exprimieren. 48 h nach der Transduktion wurden die R5B-Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten μ H- und Ig κ -spezifischen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (**Abb. 15A, B**). Auf der Oberfläche der Leervektor- als auch der MOCK-transduzierten Zellen konnte weder Ig μ noch Ig κ detektiert werden. Die beiden Ig-Ketten konnten hingegen auf der Oberfläche der WEHI-231 nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden sie auf der Oberfläche der mit dem rekombinanten BZR transduzierten Zellen detektiert. Dabei ist auffällig, dass alle transduzierten (und somit eGFP⁺) Zellen sowohl für μ H als auch für Ig κ positiv waren ($\sim 28\%$ Ig $\kappa^+\mu$ H⁺). Es konnte keine Zelle detektiert werden, die entweder nur die eine oder die andere Ig-Kette auf ihrer Oberfläche exprimierte – die beiden Ketten wurden immer ko-exprimiert. Dies ist insofern interessant, als dass in den zuvor analysierten CHO-K1-Zellen neben korrekt gespaltenen Ig-Ketten auch ungespaltenes Produkt detektiert wurde. Es bedeutet auch, dass die vom Furin und FMDV-2A-Peptid vermittelten Spaltereignisse insofern effizient waren, als dass sie in der Oberflächenexpression des rekombinanten MD4 BZR in einer *rag*-defizienten B-Zelllinie resultieren. Eine Expression des retrogenen MD4 BZR *in vivo* sollte somit möglich sein.

Die beiden Ig-Ketten konnten zudem intrazellulär detektiert werden (**Abb. 15B**). Auch hier wurden beide Ketten stets ko-exprimiert ($\sim 27\%$ Ig $\kappa^+\mu$ H⁺).



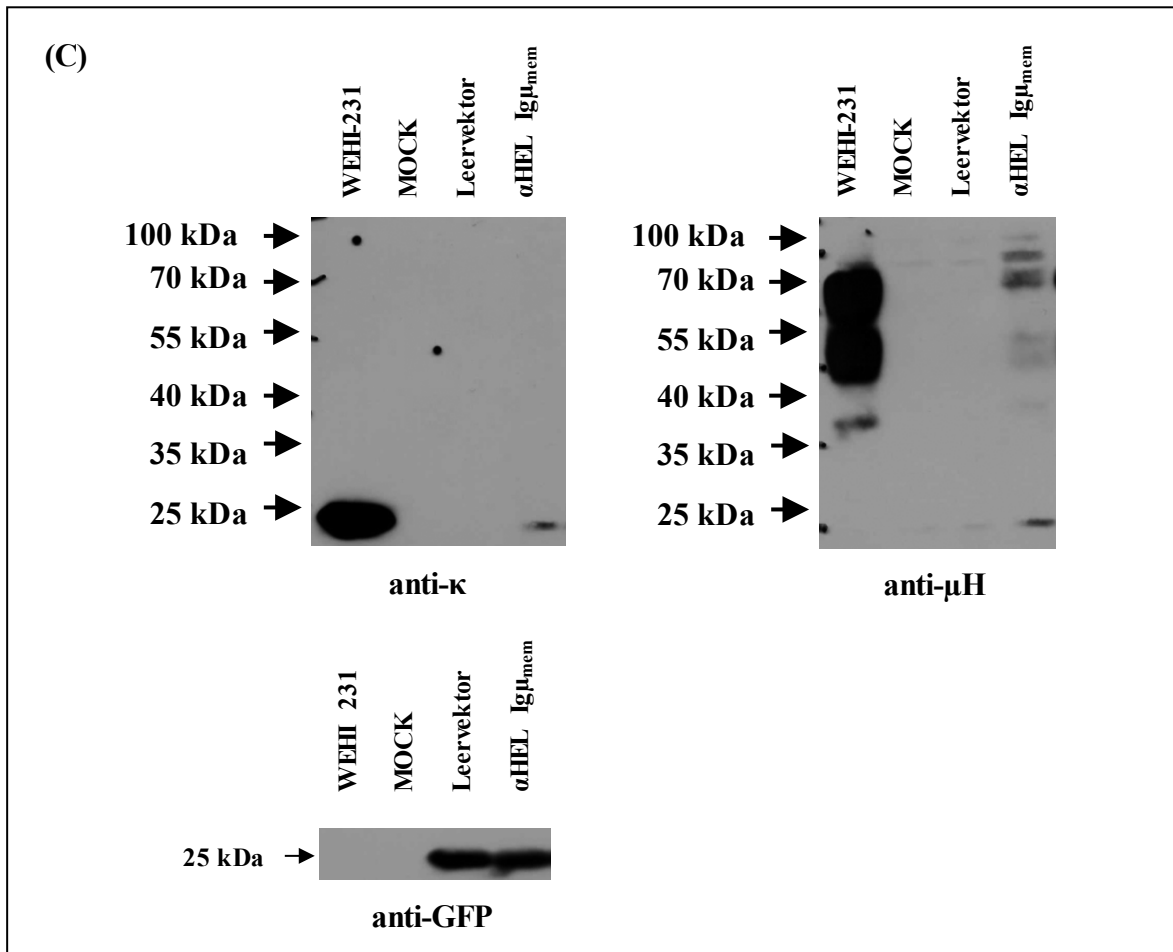


Abb. 15. *In vitro*-Expression des rekombinanten MD4 BZR_s. Die Pro-B-Zelllinie R5B wurde mit virus-haltigen Überständen, die für den rekombinanten HEL-spezifischen BZR kodieren, infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen entweder durchflusszytometrisch oder im Western Blot analysiert. Dabei diente die B-Zell-Lymphomlinie WEHI-231 als Positivkontrolle. Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern für Ig μ und Ig κ zeigt deren spezifische Expression sowohl auf der Oberfläche der infizierten R5B (A) als auch intrazellulär (B). Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. (C) Lysate der infizierten R5B-Zellen wurden auf Proteinebene auf die Expression der κ - und μ H-Kette untersucht. Eine Expression der Ig-Ketten konnte ausschließlich in den Lysaten der Zellen detektiert werden, die mit für den rekombinanten BZR-kodierenden Virusüberständen infiziert wurden. Die Inkubation mit einem anti-GFP-Antikörper diente als interne Kontrolle. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Die stöchiometrische Expression der beiden Ig-Ketten konnte auch auf Proteinebene gezeigt werden. Dafür wurden Lysate der transduzierten R5B im Western Blot analysiert. Nach Inkubation mit anti-Maus μ H- und Ig κ -spezifischen Antikörpern, wurden in den Lysaten von Zellen, die mit virushaltigen Überständen für den rekombinanten BZR infiziert wurden, Banden mit einem Molekulargewicht von ~ 28 kDa bzw. ~ 70 kDa detektiert. Hingegen konnten diese Banden nicht in den Lysaten der untransduzierten bzw. der MOCK-transduzierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 15C).

3.5. Generierung von OTII-T-Zell-Rezeptor retrogenen Mäusen

Da bislang ausschließlich die Generierung TZR retrogener Mäuse beschrieben ist, wurden zunächst auf Grundlage des von Holst et al. (Holst, Szymczak-Workman et al. 2006) beschriebenen Protokolls OTII-TZR retrogene Mäuse generiert. Der OTII-T-Zell-Rezeptor erkennt spezifisch Hühner-Ovalbumin (Peptid 323-339) im Kontext des MHC Klasse II I-A^b Moleküls. Die OTII-TZR transgene Linie wurde durch Koinjektion des TZR α/β -Konstruktes unter Verwendung des endogenen TZR-Promotors generiert; die *Founderlinie* wurde auf den C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt (Barnden, Allison et al. 1998). Die OTII-spezifischen *Producer*-Zellen für die Generierung der OTII-TZR retrogenen Mäuse wurden freundlicherweise von D.A.A Vignali (Memphis, Tennessee, USA) zur Verfügung gestellt. Für die Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfängerermäuse (C57BL/6 Wildtyp) wurden $\sim 4 \times 10^6$ transduzierte Knochenmarksstammzellen intravenös injiziert. Um den optimalen Zeitpunkt für die Analyse der Tiere zu ermitteln, wurden den Tieren beginnend ab 2 Wochen nach der Rekonstitution regelmäßig Blut entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Auf diese Weise konnte die Rekonstitution bzw. die Repopulation des Immunsystems verfolgt werden. Die durchflusszytometrische Analyse der retrogenen Tiere 8 Wochen nach Rekonstitution zeigte, dass der Ovalbumin-spezifische TZR in den untersuchten lymphatischen Organen exprimiert wurde (nach Färbung mit Fluorochrom-konjugierten TZR α 2- und TZR β 5.1/5.2-spezifischem Antikörpern). In **Abb. 16** ist exemplarisch die durchflusszytometrische Analyse der Milz dargestellt; die Analyse der Lymphknoten ist im Anhang in **Abbildung A10** dargestellt. Rund 3,6% der in der Milz der retrogenen Tiere analysierten Zellen waren transduziert und somit eGFP-positiv. Vergleichend wurden die lymphatischen Organe OTII-TZR-transgener Tiere auf die Expression der TZR α 2- und TZR β 5.1/5.2-TZR-Ketten analysiert. Während die Ketten des Ovalbumin-spezifischen TZRs auf $\sim 75\%$ der CD4⁺ T-Zellen in den transgenen Kontrollen detektiert wurde (Gating auf eGFP⁺CD4⁺), konnte sie in einer deutlich geringeren Frequenz in den retrogenen Mäusen detektiert werden ($\sim 16\%$; Gating auf eGFP⁺CD4⁺). Die allgemein geringere Frequenz an retrogenen verglichen mit transgenen T-Zellen in den analysierten Mäusen wurde bereits von Holst et al. beschrieben und als Nachteil des retrogenen (im Gegensatz zum konventionellen transgenen) System gewertet.

Auffallend ist ebenfalls die nicht zu vernachlässigende Population an eGFP⁺CD4⁻ Zellen (siehe **Abb. 16A**). Hierbei handelt es sich um Zellen, die transduziert wurden, sich jedoch nicht in die T-Zelllinie entwickelt haben, da sie den CD3-Co-Rezeptor nicht exprimieren (Daten nicht gezeigt). Auch sie wurden von Holst et al. beschrieben (Holst, Szymczak-Workman et al. 2006).

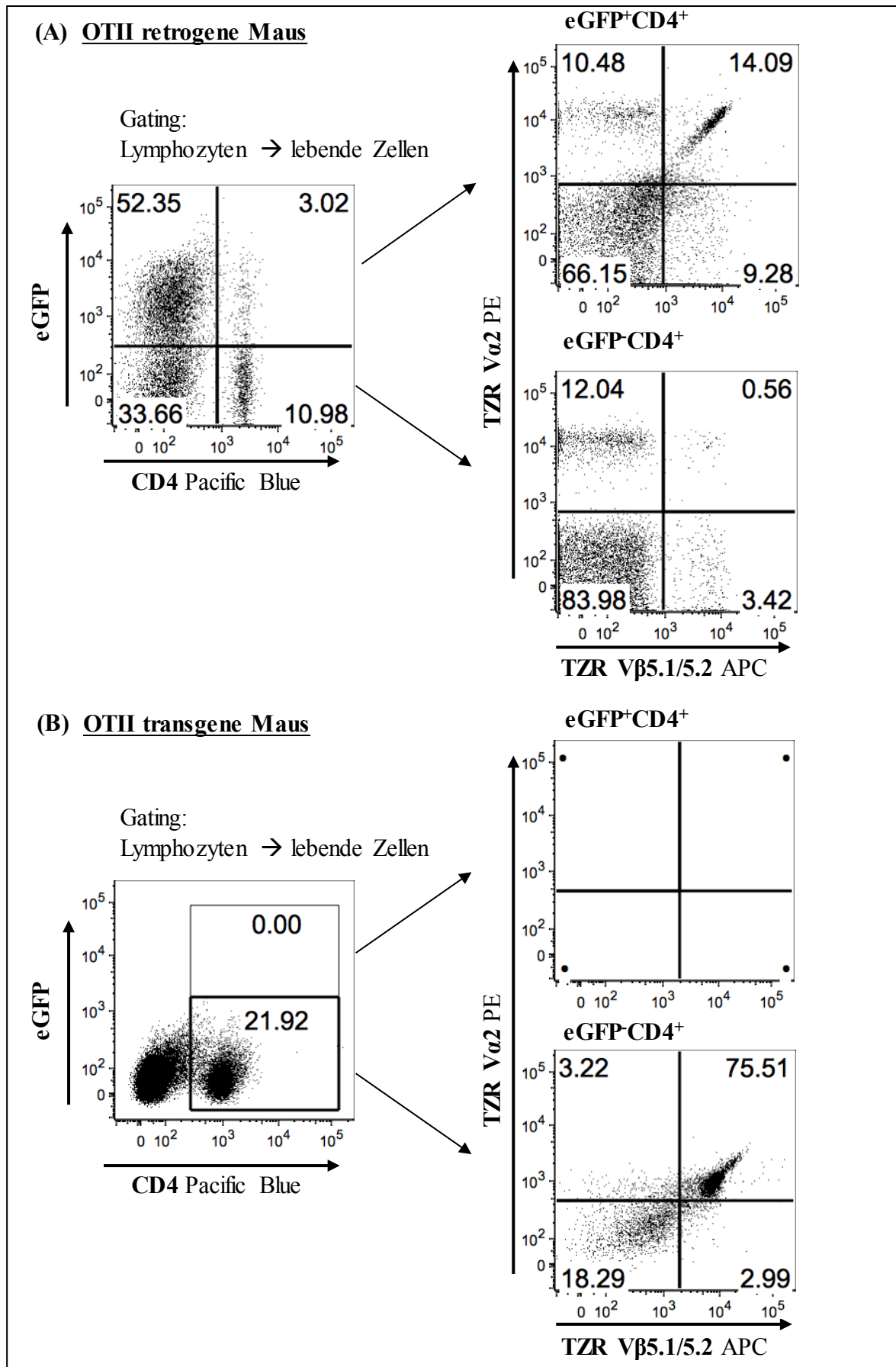


Abb. 16. Generierung OTII TZR retrogener Mäuse. Die TZR retrogenen Mäuse wurden, wie in Materialien und Methoden beschrieben, generiert und circa 8 Wochen nach Rekonstitution auf die Expression des

Retrogens untersucht. Dafür wurden Einzelzellsuspensionen von Milz und Lymphknoten mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern spezifisch für CD4 sowie die OTII TZR-Ketten V α 2 und V β 5.1/5.2 inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. In der OTII TZR retrogenen Maus konnte der OTII-spezifische TZR auf ~ 16,5% der eGFP⁺CD4⁺ T-Zellen detektiert werden (**A**), wohingegen er in der OTII transgenen Maus auf ~75,5% der eGFP⁺CD4⁺ T-Zellen detektiert werden konnte (**B**). Repräsentativ dargestellt sind die Ergebnisse für die Milz je einer Maus aus beiden Gruppen. Die Zahlen in den Quadranten geben an, wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. Tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

3.6. Optimierung der *in vitro* Kulturbedingungen der Donor-Knochenmarksstammzellen

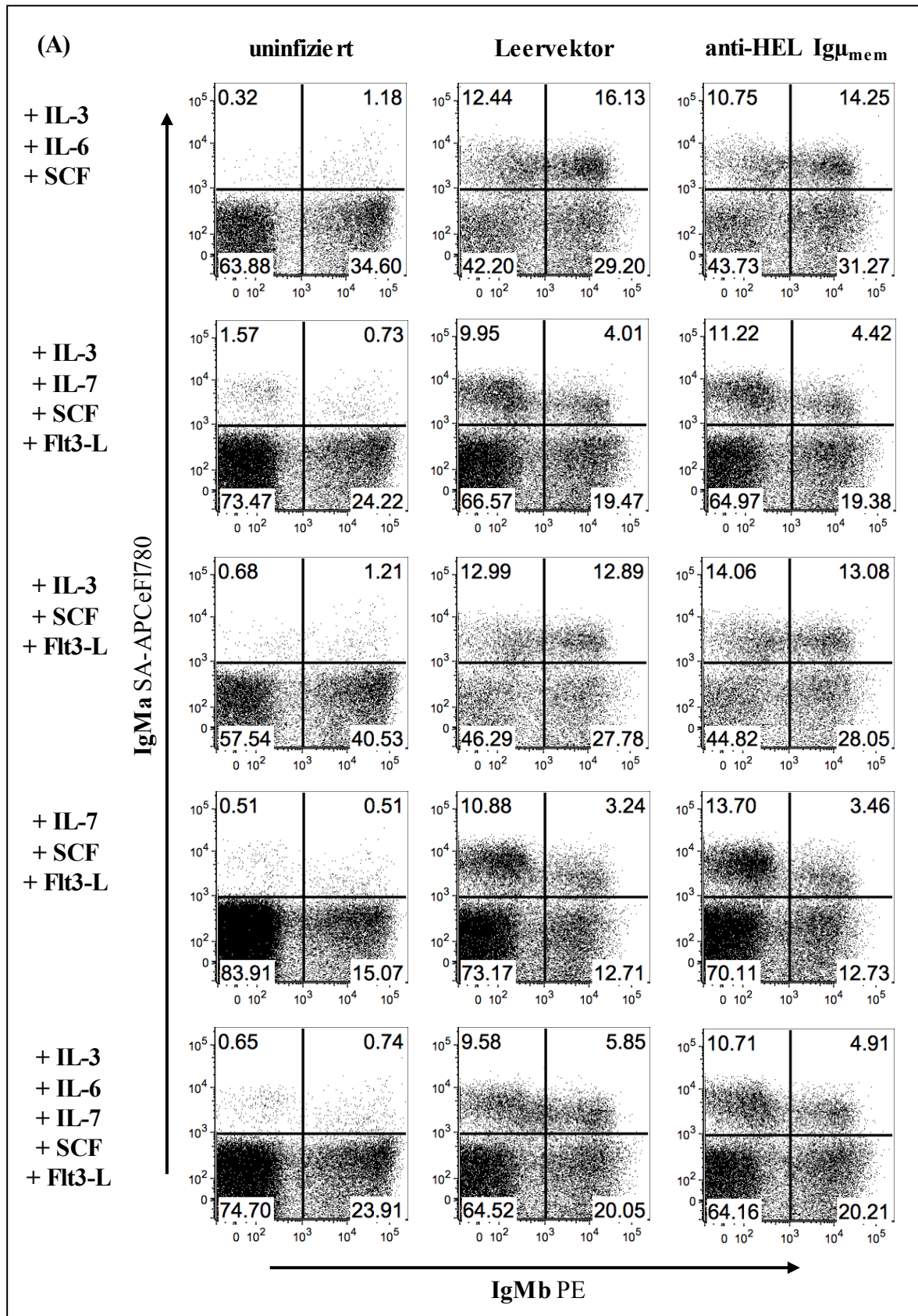
Im nächsten Schritt wurden die *in vitro* Kulturbedingungen für die retrovirale Transduktion der Donor-Stammzellen zur Generierung der BZR retrogenen Mäuse modifiziert. Dadurch sollten die Donor-Zellen bereits *in vitro* in die B-Zelllinie dirigiert werden. Das ursprüngliche Protokoll von Holst et al. verwendet IL-3, IL-6 und den Wachstumsfaktor SCF (*stem cell factor*, Stammzellfaktor) (Holst, Szymczak-Workman et al. 2006).

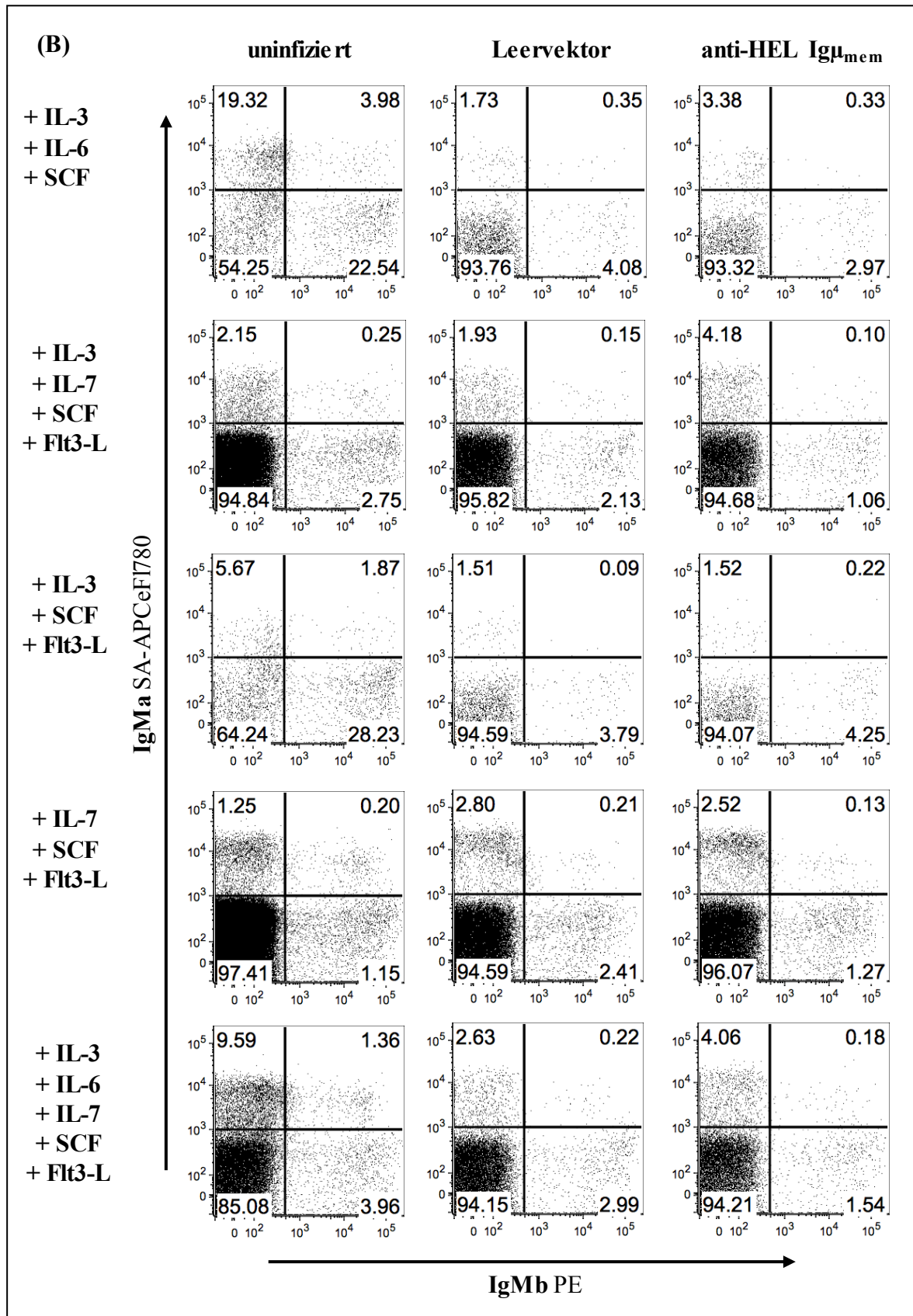
In der vorliegenden Arbeiten wurden nun in mehreren Ansätzen verschiedene Zytokin-kombinationen ausgetestet; neben den bereits genannten Zytokinen wurden den Kulturen auch IL-7 und *Fms-like tyrosine kinase* 3-Ligand (Flt3-L) zugegeben (Nagasawa 2006, Herzog, Reth et al. 2009, Kurosaki, Shinohara et al. 2010).

Die Donor-Zellen wurden zunächst für 48 h mit der jeweiligen Zytokinkombination kultiviert und anschließend mit den retroviralen Überständen infiziert. Nach weiteren 24 h bzw. 4 Tagen wurden die Zellen am Durchflusszytometer auf die Expression des HEL-spezifischen BZRs sowie anderer B-Zell-Marker analysiert und die Transduktionsrate bestimmt (**Abb. 17**). Bereits 24 h nach der Infektion konnten Unterschiede in der Expression des CD19 sowie des IgM^a detektiert werden. Die Kultivierung der Donor-Zellen mit den Zytokinen IL-3, SCF und Flt3-L induzierte zu diesem frühen Zeitpunkt die stärkste IgM^a-Expression (**Abb. 17A**). Nach weiteren 4 Tagen expandierten jene transduzierten (eGFP⁺) Zellen am stärksten, deren Kultur unter anderem IL-7 enthielt (**Abb. 17C**). Unter dieser Bedingung konnten zwischen ~ 6 und 48% eGFP⁺ Zellen detektiert werden, wobei die Donor-Stammzellen unter Zugabe von IL-3, IL-6 und SCF sowie der Kombination IL-3, SCF und Flt3-L am geringsten expandierten (~ 0,8 bis ~ 4% eGFP⁺; **Abb. 17C**). Die Zugabe von IL-7 induzierte nicht nur die stärkste Expansion der transduzierten Zellen, auch konnte unter diesen Kulturbedingungen die stärkste Expression des retrogenen BZRs (identifiziert durch Färbung mit dem Allotyp-spezifischen IgM^a-Antikörper) detektiert werden (zwischen 15 und 27% IgM^{a+}; **Abb. 17A**). Allgemein wurde zum zweiten Analysezeitpunkt (4 Tage nach Infektion) eine geringere Frequenz an retrogenen (IgM^{a+}) Zellen detektiert; wo-

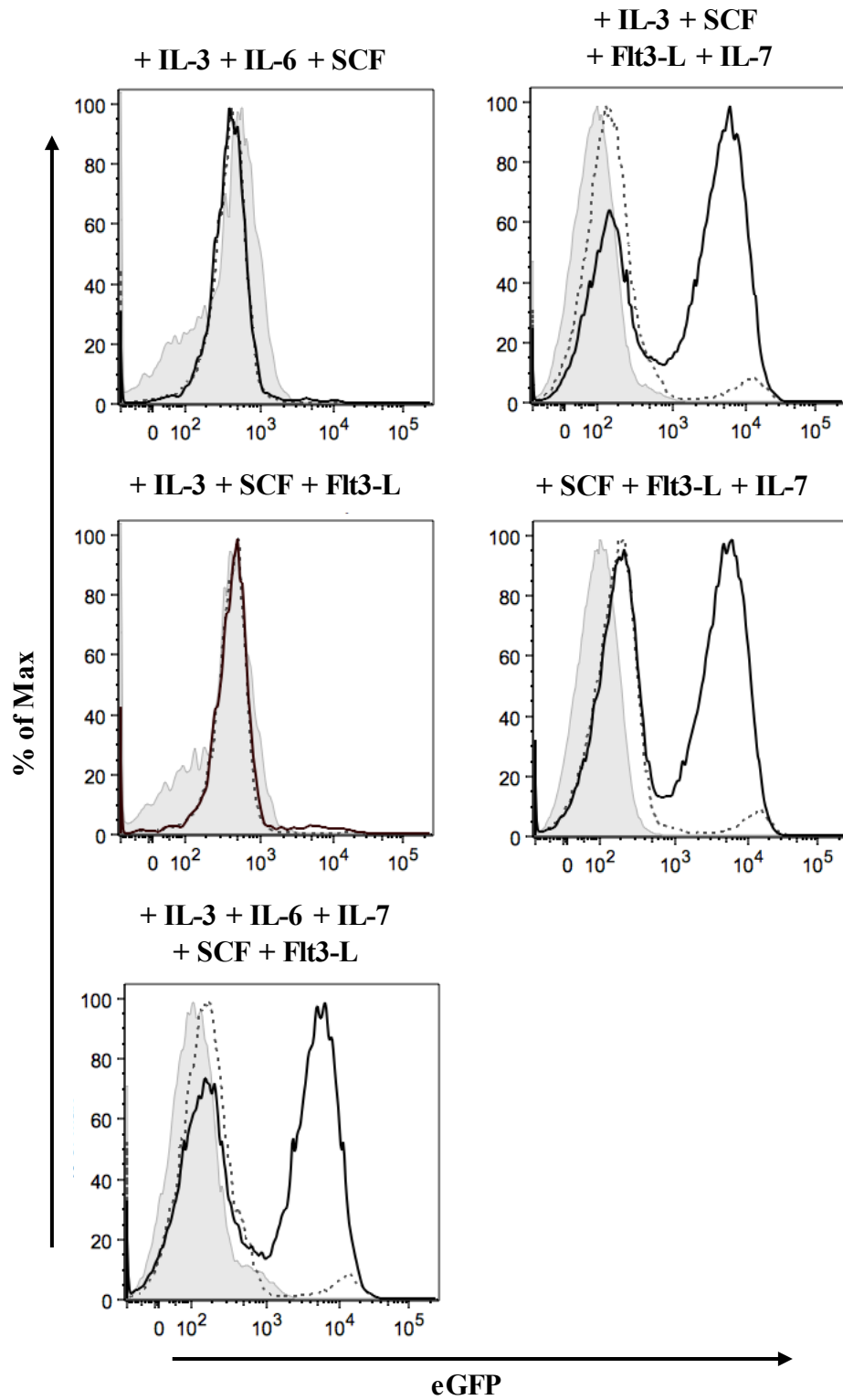
hingegen der Anteil transduzierter (eGFP⁺) Zellen verglichen mit dem Zeitpunkt 24 h post-Infektion angestiegen ist. Betrachtet man 4 Tage nach Infektion die Zellzahlen vergleichend unter den getesteten Kulturbedingungen, so ist festzustellen, dass die Zellen – bis auf eine Ausnahme – expandiert sind (**Abb. 17D**). Die stärkste Expansion konnte dabei für mit dem retrogenen BZR transduzierte Zellen unter Zugabe von IL-3, IL-6, SCF, Flt3-L und IL-7, gefolgt von der Kultivierung mit IL-3, SCF, Flt3-L und IL-7, beobachtet werden.

Die Entscheidung für eine der getesteten Kulturbedingungen als optimale Bedingung wurde neben der Transduktionseffizienz und der Expressionsrate des retrogenen BZR auch von den ermittelten Zellzahlen (4 Tage nach Infektion) abhängig gemacht. Daher wurde als optimale Kulturbedingung die Zugabe von IL-3, IL-6, IL-7, SCF und Flt3L ermittelt und diese Zytokine in allen weiteren Experimenten den Kulturen zugegeben.





(C)



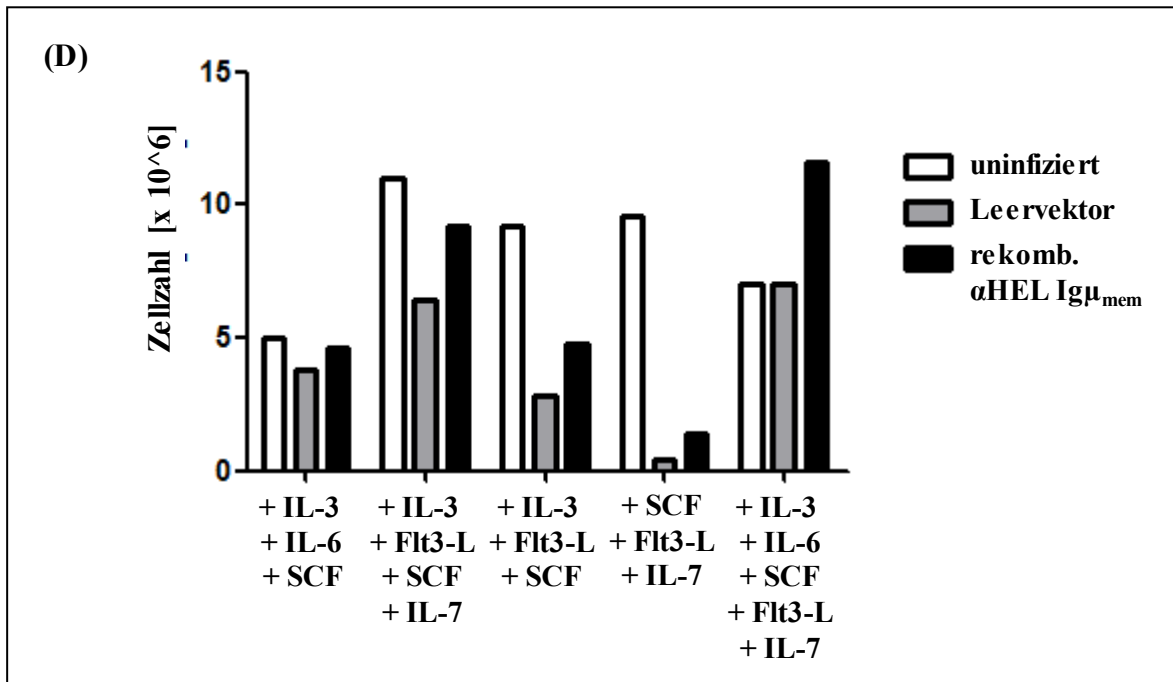


Abb. 17. Austestung unterschiedlicher *in vitro* Kulturbedingungen für eine optimierte Infektion der Donor-Knochenmarkstammzellen. Die Knochenmarkstammzellen wurden 72 h nach Applikation des 5-FU aus Femur und Tibia der Spender-Mäuse isoliert und für 48 h unter Zugabe verschiedener Zytokinkombinationen kultiviert. Für die Infektion wurden die Spender-Zellen in virusbeschichtete Wells überführt und für 24 h unter identischen Zytokinkombinationen weiterkultiviert. Danach wurden sie entweder (A) durchflusszytometrisch analysiert oder (B) von den virusbeladenen Wells herunter gewaschen, für weitere 4 Tage unter Zugabe der Zytokine kultiviert und anschließend analysiert. (C) Darstellung der MFIs für die verwendeten Virusüberstände sortiert nach den unterschiedlichen Kulturbedingungen (4 Tage nach Infektion). Grau – uniniziert, gestrichelt – Leervektor, schwarz – α HEL Ig μ_{mem} . (D) Zellzahlen 4 Tage nach Infektion. Dargestellt sind die Gesamtzellzahl pro getesteter Kondition; eingesät wurden mind. $1,3 \times 10^6$ Zellen pro Kondition. Weiß – uniniziert, grau – Leervektor, schwarz – α HEL Ig μ_{mem} . (A) und (B) Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. Tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

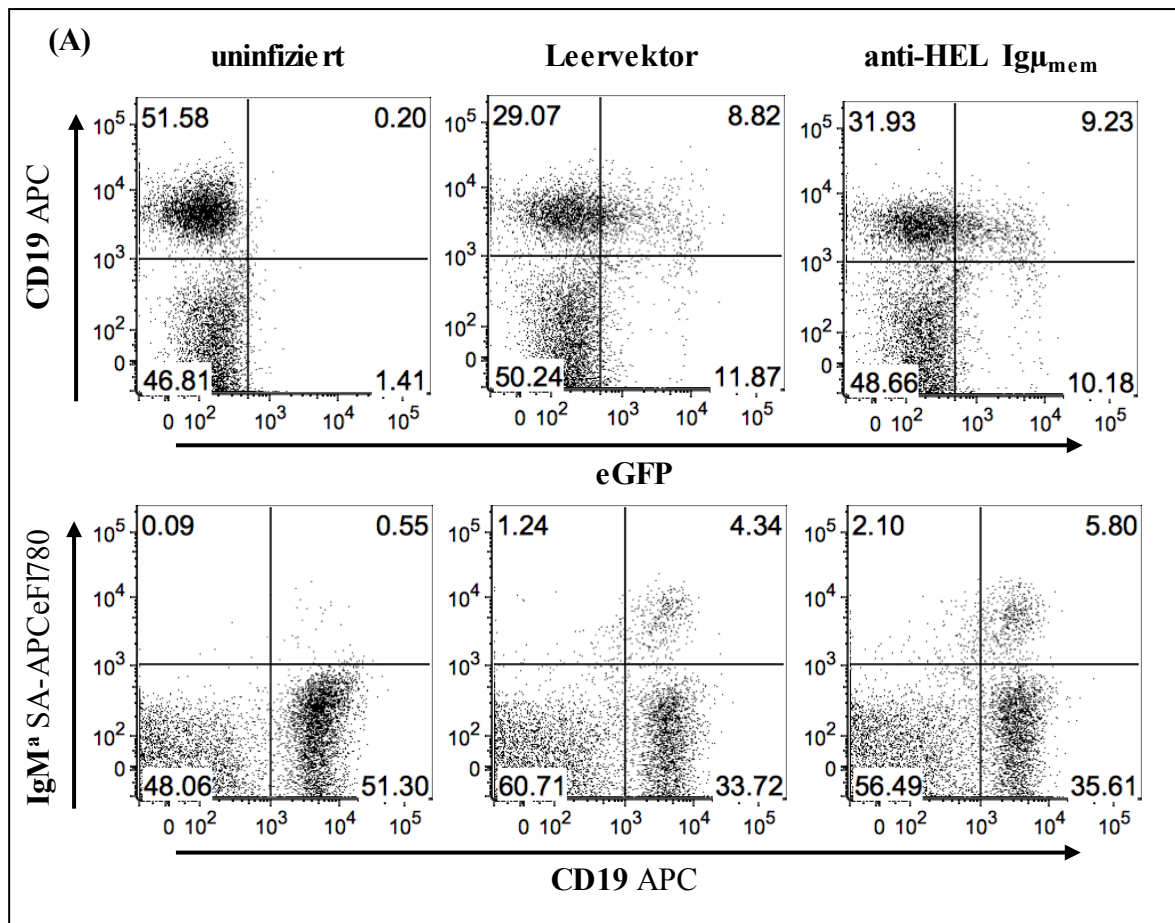
3.7. Generierung MD4 B-Zell-Rezeptor-retrogener Mäuse

3.7.1. Analyse der transduzierten Donorstammzellen für die Rekonstitution der Empfängermause

Die unter den oben beschriebenen Bedingungen kultivierten Donor-Stammzellen (C57BL/6 Wildtyp) wurden mit virushaltigen Überständen für den rekombinanten MD4-spezifischen BZR transduziert. Die transduzierten Zellen wurden neben der Rekonstitution der Empfängermause auch durchflusszytometrisch analysiert; dabei wurde die Expression der bereits zuvor analysierten Oberflächenmarker untersucht. Die transduzierten Zellen wurden – analog zum Experiment bei dem unterschiedliche *in vitro* Kulturbedingungen getestet wurden – sowohl 24 h als auch 5 Tage nach Infektion analysiert. Die mit dem retrogenen MD4 BZR transduzierten Zellen wurden dabei mit Leervektor transduzierten Zellen sowie uninizierten Zellen verglichen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 18** dargestellt. 24 Stunden post-Infektion betrug der Anteil transduzierter (eGFP⁺) Zellen ~ 19% (**Abb. 18A**).

ERGEBNISSE

Dieser Anteil stieg auf $\sim 50\%$ nach weiteren 4 Tagen in Kultur (**Abb. 18B**). Der Anteil $CD19^+$ Zellen stieg von $\sim 41\%$ (24 h p.i.) auf $\sim 61\%$ (5 d p.i.). Dies lässt vermuten, dass die transduzierten Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen proliferieren, und dass die Donor-Stammzellen in B-Lymphozyten differenzieren. Bei den mit Kontrollüberständen (pR1330 Leervektor) transduzierten Zellen betrug der Anteil $eGFP^+$ Zellen $\sim 21\%$ (24 h p.i.) bzw. $\sim 29\%$ (5 d p.i.); der Anteil der $CD19^+$ B-Lymphozyten betrug $\sim 38\%$ (24 h p.i.) bzw. $\sim 53\%$ (5 d p.i.).



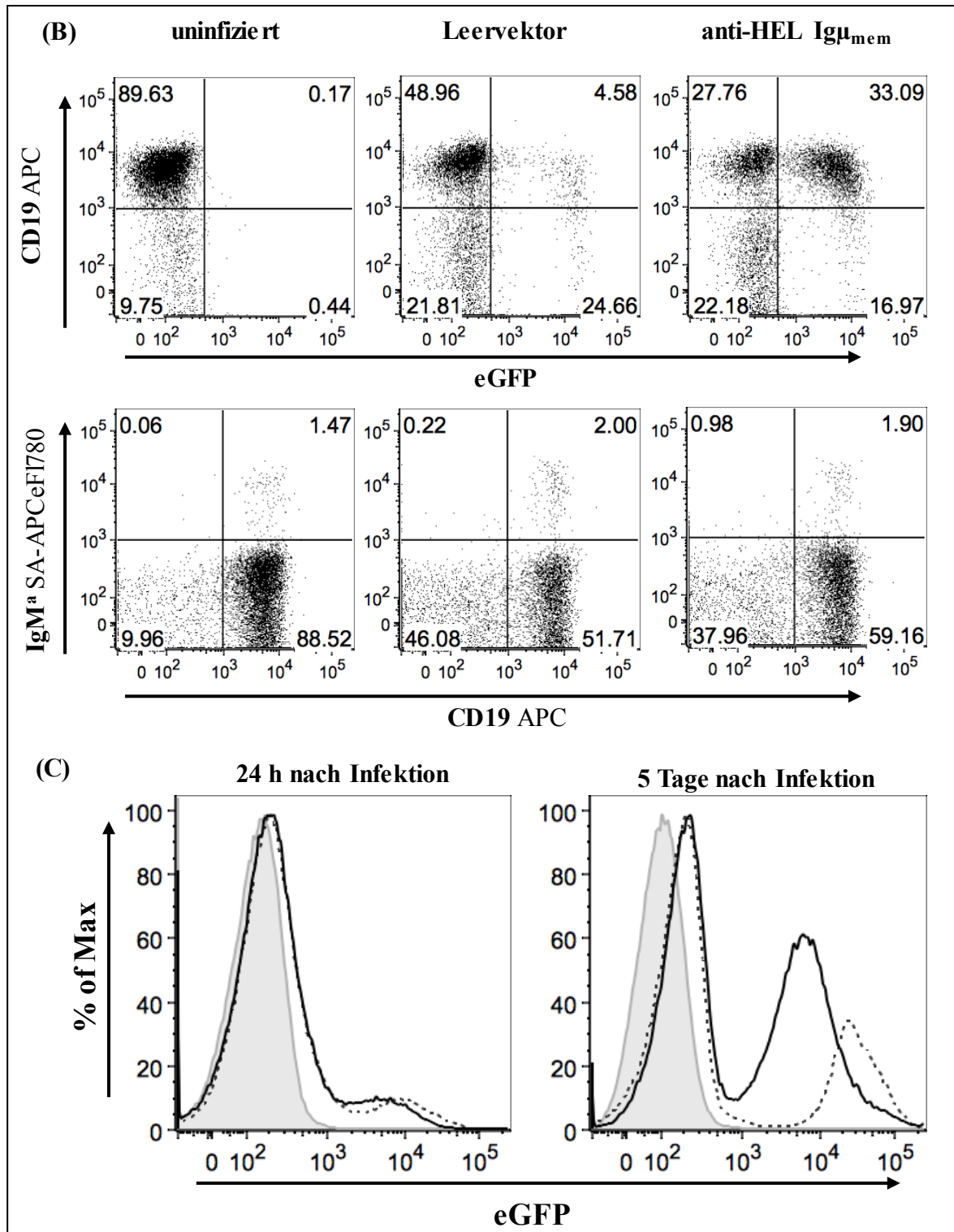


Abb. 18. Infektion des Spender-Knochenmarks. Die Knochenmarksstammzellen wurden 72 h nach Applikation des 5-FU aus Femur und Tibia der Donor-Mäuse (C57BL/6 Wildtyp) isoliert und für 48 h unter Zugabe von SCF, IL-3, IL-6, IL-7 und Flt3-L *in vitro* kultiviert. Für die Infektion wurden die Donor-Zellen in virusbeschichtete Wells überführt und für 24 h unter identischen Bedingungen kultiviert. Danach wurden sie entweder zur Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfänger verwendet oder **(A)** durchflusszytometrisch auf die Expression von eGFP, CD19 und IgM^a analysiert. **(B)** Ein Teil der Zellen aus **(A)** wurde von den virusbeladenen Wells herunter gewaschen und für weitere 4 Tage unter Zugabe der Zytokine kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch auf die Expression von eGFP, CD19 und IgM^a analysiert. **(C)** Getrennt nach den beiden Analysenzeitpunkten wurden die MFIs für die jeweilig verwendeten Virusüberstände dargestellt. Hellgrau – uninfiziert, dunkelgrau – Leervektor, schwarz – α HEL Ig μ_{mem} . **(A)** und **(B)** Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. Tote Zellen wurden durch Färbung mit pi ausgeschlossen.

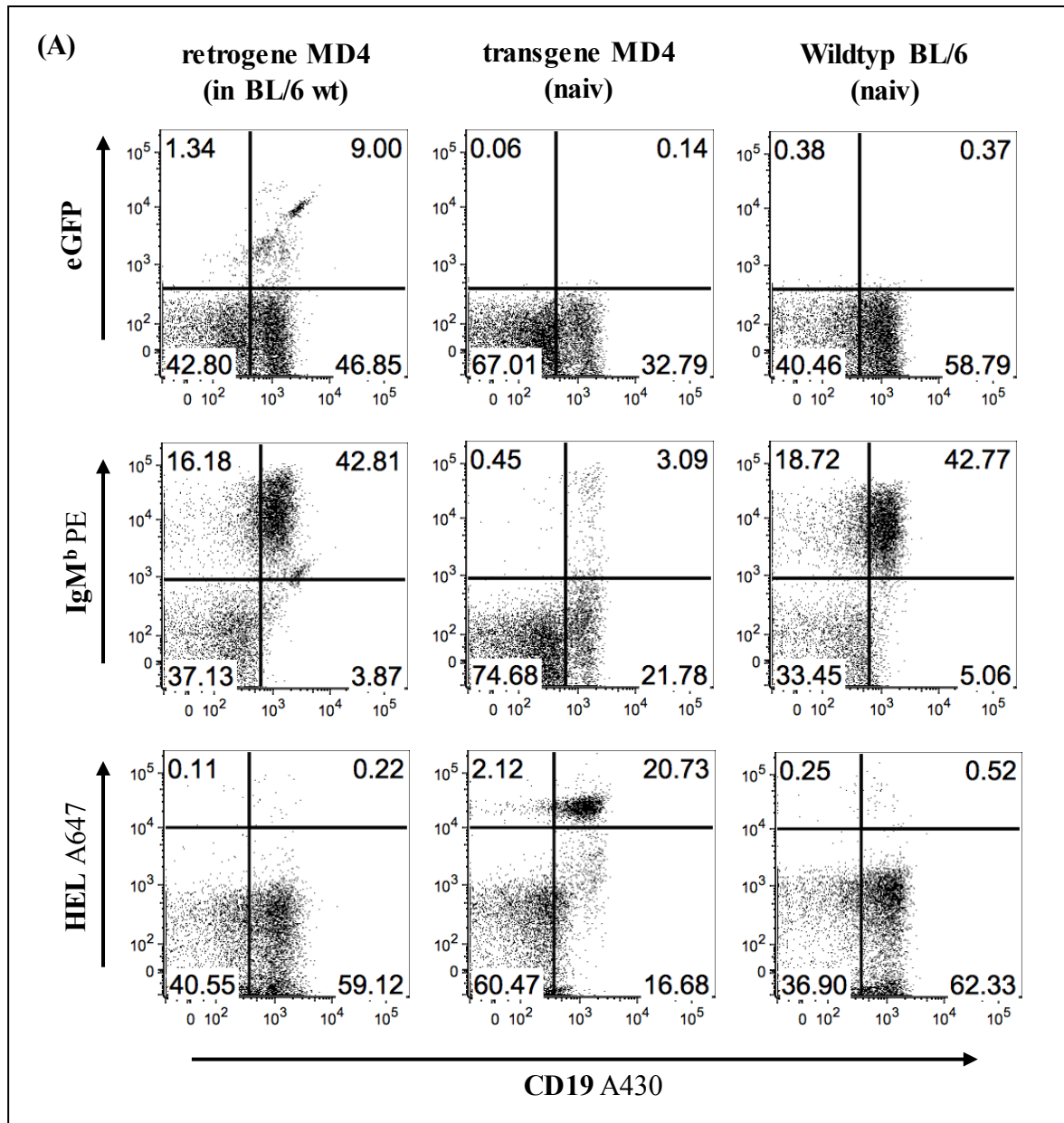
3.7.2. Rekonstitution von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen mit retrogen transduziertem Knochenmark

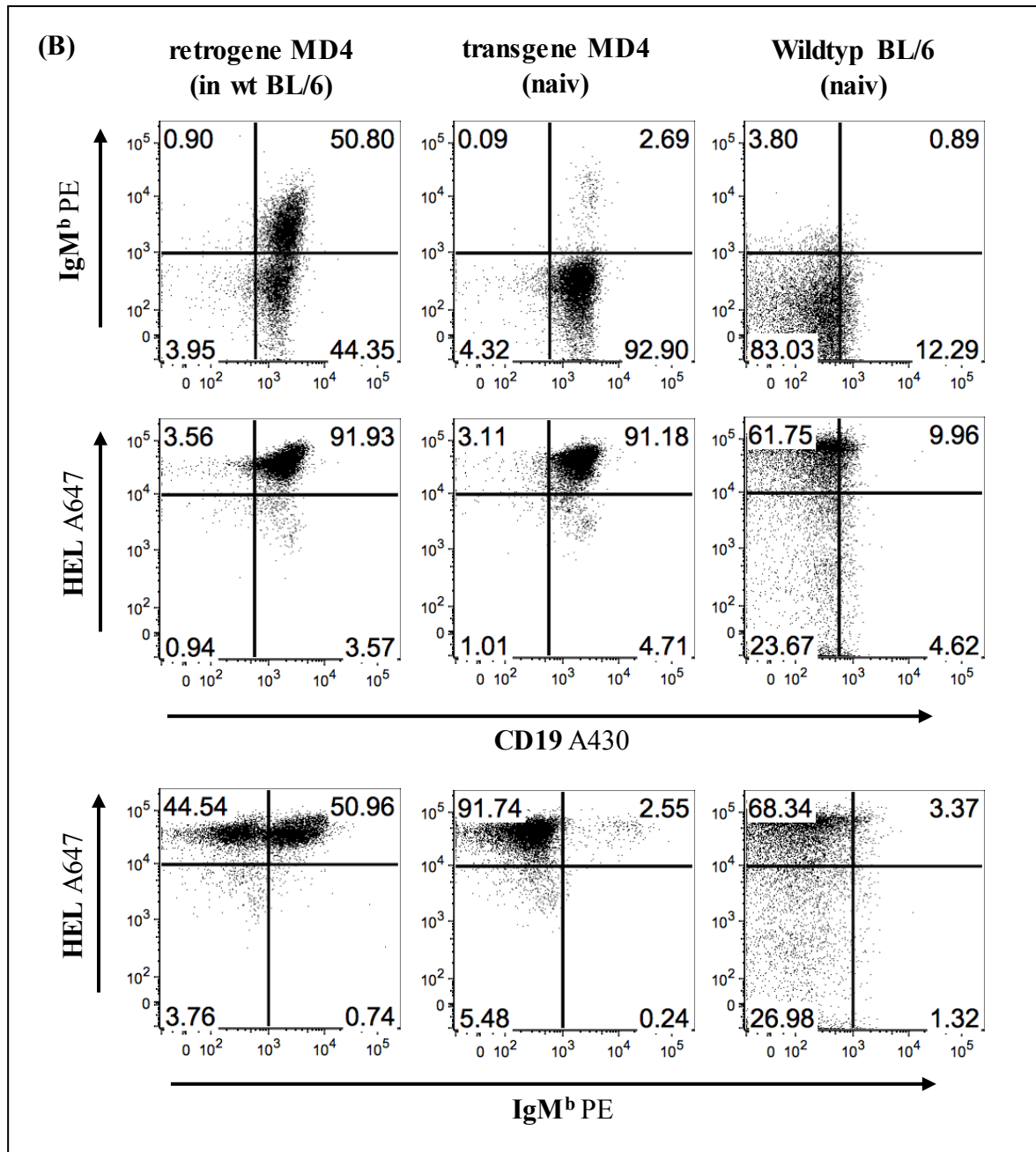
Für die Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfängerermäuse wurden mindestens 2×10^6 transduzierte Donor-Zellen pro Empfänger intravenös injiziert. Beginnend ab 2 Wochen nach der Rekonstitution wurde den Tieren regelmäßig Blut entnommen und durchflusszytomtrisch analysiert, um die Repopulation der lymphatischen Organe zu verfolgen und somit den optimalen Analysenzeitpunkt zu ermitteln. Circa 8 Wochen nach der Rekonstitution wurden die Tiere getötet, Einzelzellsuspensionen von Milz, Lymphknoten, Knochenmark und Blut wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern inkubiert und durchflusszytomtrisch analysiert.

In **Abbildung 19** sind exemplarisch die Ergebnisse für die Milz dargestellt. Die Gating-Strategie ist in **Abbildung A11** im Anhang gezeigt. Es konnten $\sim 10\%$ eGFP⁺ (und somit transduzierte) Zellen detektiert werden. Gleichzeitig exprimierten die transduzierten Zellen die endogene μ H-Kette (IgM^b) im gleichen Ausmaß wie die Wildtyp-Kontrolle (42,81% und 42,77% CD19⁺IgM^{b+}). Der rekombinante HEL-Ig μ_{mem} BZR konnte nicht auf der Oberfläche der analysierten retrogenen Zellen detektiert werden, hingegen wurde er auf der Oberfläche der als Kontrolle mitgeführten transgenen MD4 B-Zellen nachgewiesen.

Obwohl der retrogene BZR nicht auf der Oberfläche exprimiert wurde, konnte er intrazellulär nachgewiesen werden (91,93% HEL⁺ verglichen mit 91,18% für die transgene MD4 Kontrolle). Im Gegensatz zu den transgenen MD4-Mäusen exprimierten die B-Lymphozyten der analysierten retrogenen Mäuse Teile beider Rezeptoren, vermutlich in Form von chimären Molekülen, bestehend aus der HEL-spezifischen Igk- und der endogenen μ H-Kette (IgM^b). Die durchflusszytomtrische Analyse von nicht-B-Zell-Markern zeigte keine wesentlichen Unterschiede zwischen den retrogenen Tieren und den transgenen Kontrollen. In den retrogenen Tieren konnten – verglichen mit den transgenen Kontrollen – lediglich CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen mit einer leicht erhöhten Frequenz detektiert werden (27,50% und 8,59% verglichen mit 21,46% und 6,63%).

Die Ergebnisse der anderen analysierten lymphatischen Organen (Lymphknoten, Knochenmark und Blut) werden im Anhang in den **Abbildungen A12, A13 und A14** gezeigt.





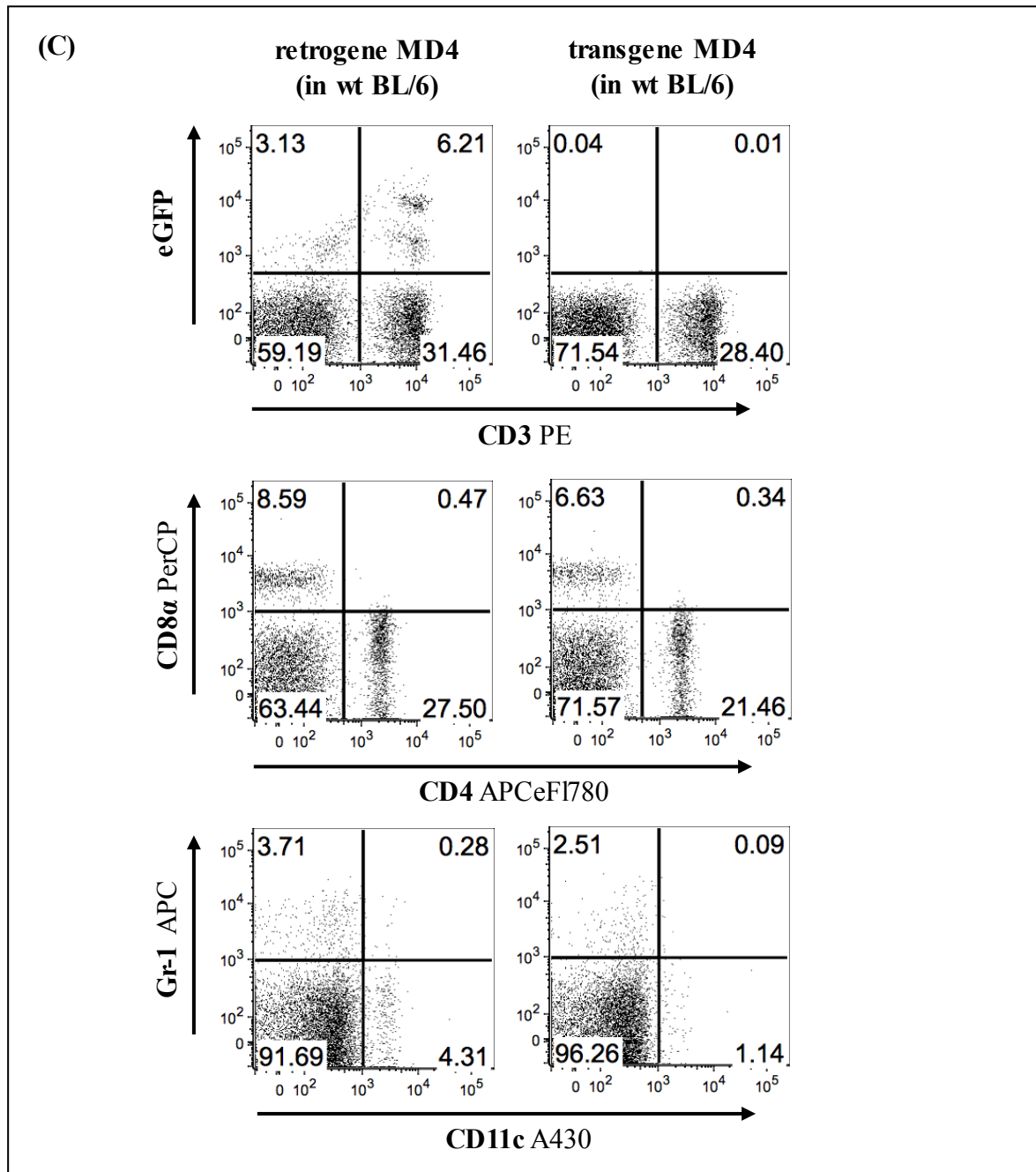


Abb. 19. Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse (C57BL/6 Wildtyp) zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens. BZR retrogene Mäuse wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben generiert. Die Analyse erfolgte ~ 8 bis 10 Wochen nach der Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfängertiere. Einzelzellsuspensionen von Milz, Lymphknoten, Knochenmark und Blut wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrollen dienten MD4 transgene sowie C57BL/6 Wildtypmäuse. Repräsentativ dargestellt sind die Ergebnisse für die Milz. (A) Oberflächenfärbung für CD19, IgM^b und HEL. Transduzierte Zellen sind eGFP⁺. Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. Tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. (B) Intrazelluläre Färbung für dieselben Parameter wie in (A). (C) Oberflächenfärbung für nicht-B-Zell-Marker (CD3, CD4, CD8, CD11c, Gr-1). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

In einem weiteren Experiment wurden Wildtyp-Mäuse mit transgenem MD4 Knochenmark rekonstituiert und circa 8 Wochen später analysiert. In der Milz konnten die zur Re-

konstitution verwendeten transgenen Zellen mit einer Frequenz von ~ 13%, in den Lymphknoten von ~ 6% detektiert werden (nach Färbung mit anti-CD19, anti-IgM^a und dem Antigen (HEL) gekoppelt an ein Fluorochrom; **Abbildung 20**).

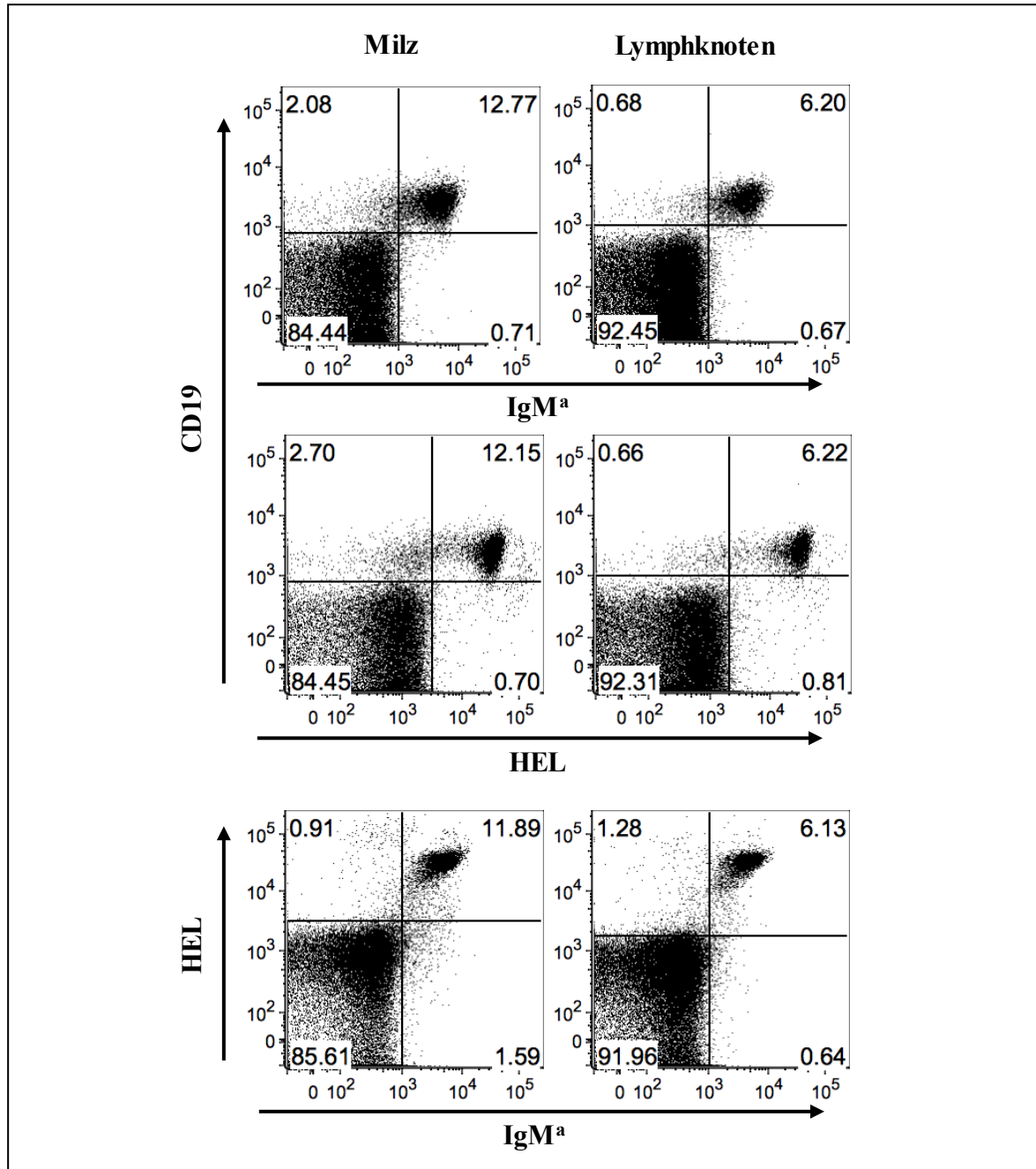
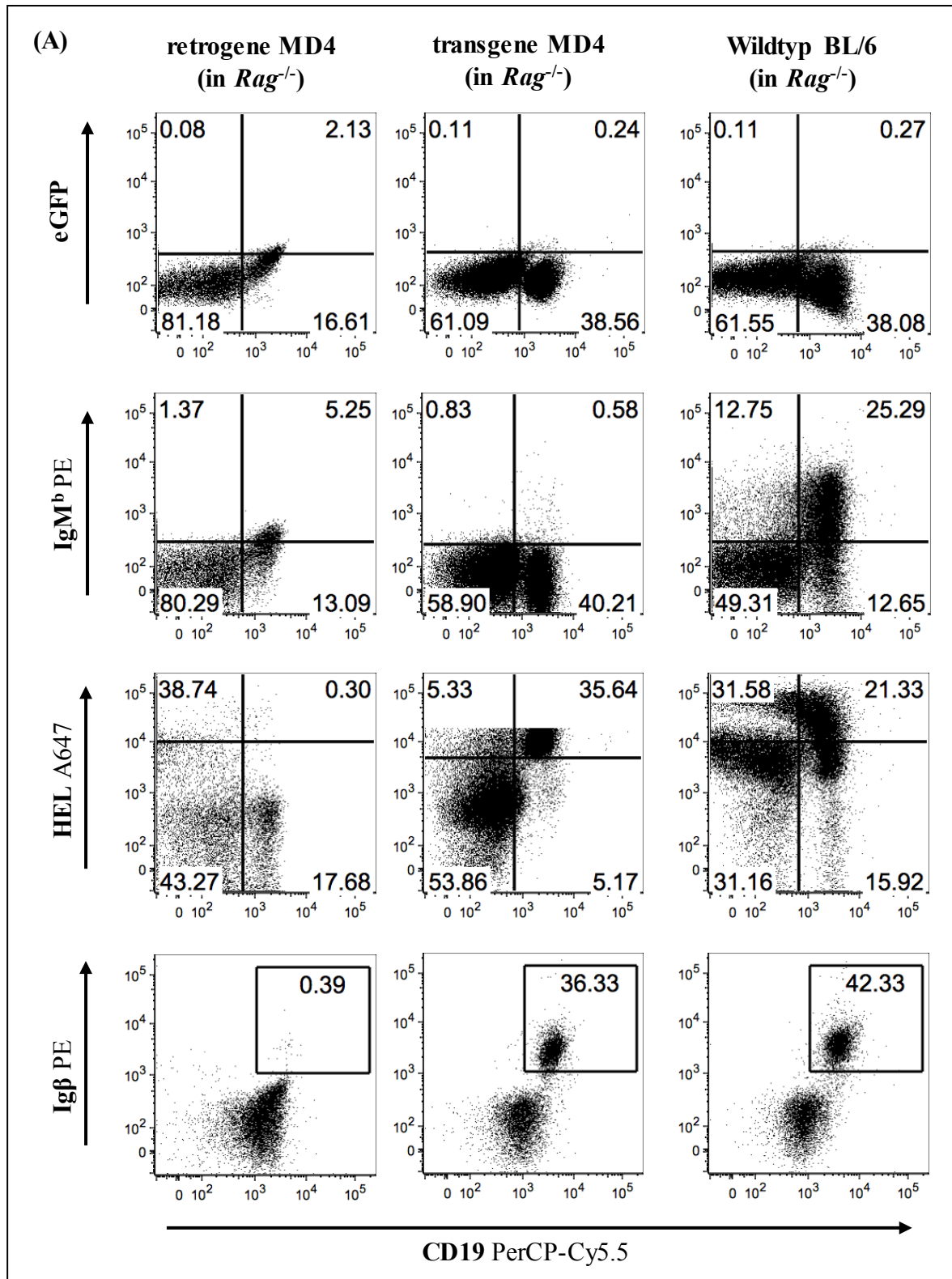


Abb. 20. Rekonstitution von Wildtypmäusen mit transgenem MD4 Knochenmark. C57BL/6 Mäuse wurden lethal bestrahlt (900 rad) und mit frisch isolierten Knochenmarkszellen aus transgenen MD4 Mäusen rekonstituiert. Die so rekonstituierten Tiere wurden nach ~ 8 bis 10 Wochen analysiert. Einzellzellsuspensionen von Milz und Lymphknoten wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern für CD19, IgM^a und dem Antigen HEL, ebenfalls an ein Fluorochrom gekoppelt, gefärbt. Tote Zellen wurden durch Färbung mit pi von der Analyse ausgeschlossen. Dargestellt sind repräsentative Plots für Milz und Lymphknoten. Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

3.7.3. Rekonstitution von *Rag*^{-/-} Mäusen mit retrogen transduziertem Knochenmark

Um die potentielle Bildung chimärer Rezeptoren, bestehend aus der endogenen schweren und der retrogenen leichten Ig-Kette, zu verhindern und gleichzeitig die eventuelle Benachteiligung der retrogenen IgM^{a+} B-Zellen gegenüber den endogenen IgM^{b+} B-Zellen aufzuheben, wurden analog des zuvor genutzten Protokolls *Rag*^{-/-} Mäuse rekonstituiert. *Rag*^{-/-} Mäuse dienten in diesem Experiment auch als Knochenmarksspender. Ihre Knochenmarksstammzellen wurden analog des zuvor genutzten Protokolls mit virushaltigen Überständen infiziert und zur Rekonstitution der bestrahlten Empfänger verwendet. Zur Kontrolle wurden parallel bestrahlte *Rag*^{-/-} Empfängertiere mit transgenem MD4 oder C57BL/6 Wildtyp Knochenmarkszellen rekonstituiert.

Die Analyse der *Rag*^{-/-} BZR retrogenen Mäuse zeigte ein den Wildtyp-BZR retrogenen Mäusen vergleichbares Ergebnis: In allen analysierten lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, Knochenmark und Blut) der rekonstituierten *Rag*^{-/-} Mäuse konnte der retrogene BZR in nur sehr geringer Frequenz nachgewiesen werden (**Abb. 21**; Ergebnisse für die Milz exemplarisch dargestellt; siehe auch **Abb. A15, A16** und **A17** im Anhang). Der Anteil transduzierter Zellen in den *Rag*^{-/-} BZR retrogenen Tieren lag bei ~ 2% in der Milz und war somit – verglichen mit den Wildtyp-BZR retrogenen Tieren – um ein Vielfaches geringer. Während der endogene BZR (IgM^b) in den mitgeführten BL/6 Wildtypkontrollen nachgewiesen wurde, konnte er bei den retrogenen Tieren zu einem geringen Teil und bei den mit transgenem MD4 Knochenmark rekonstituierten Tieren gar nicht detektiert werden (**Abb. 21A**). Die Inkubation mit dem an ein Fluorochrom gekoppelten Antigen HEL lieferte ein schwaches Signal in den BZR retrogenen Tieren. Lediglich in den mit transgenem MD4 Knochenmark rekonstituierten Tieren konnte eine eindeutige Population an HEL⁺ Zellen detektiert werden (~ 36% CD19⁺HEL⁺); die Analyse der Wildtypkontrolle zeigte eine unspezifische Färbung.



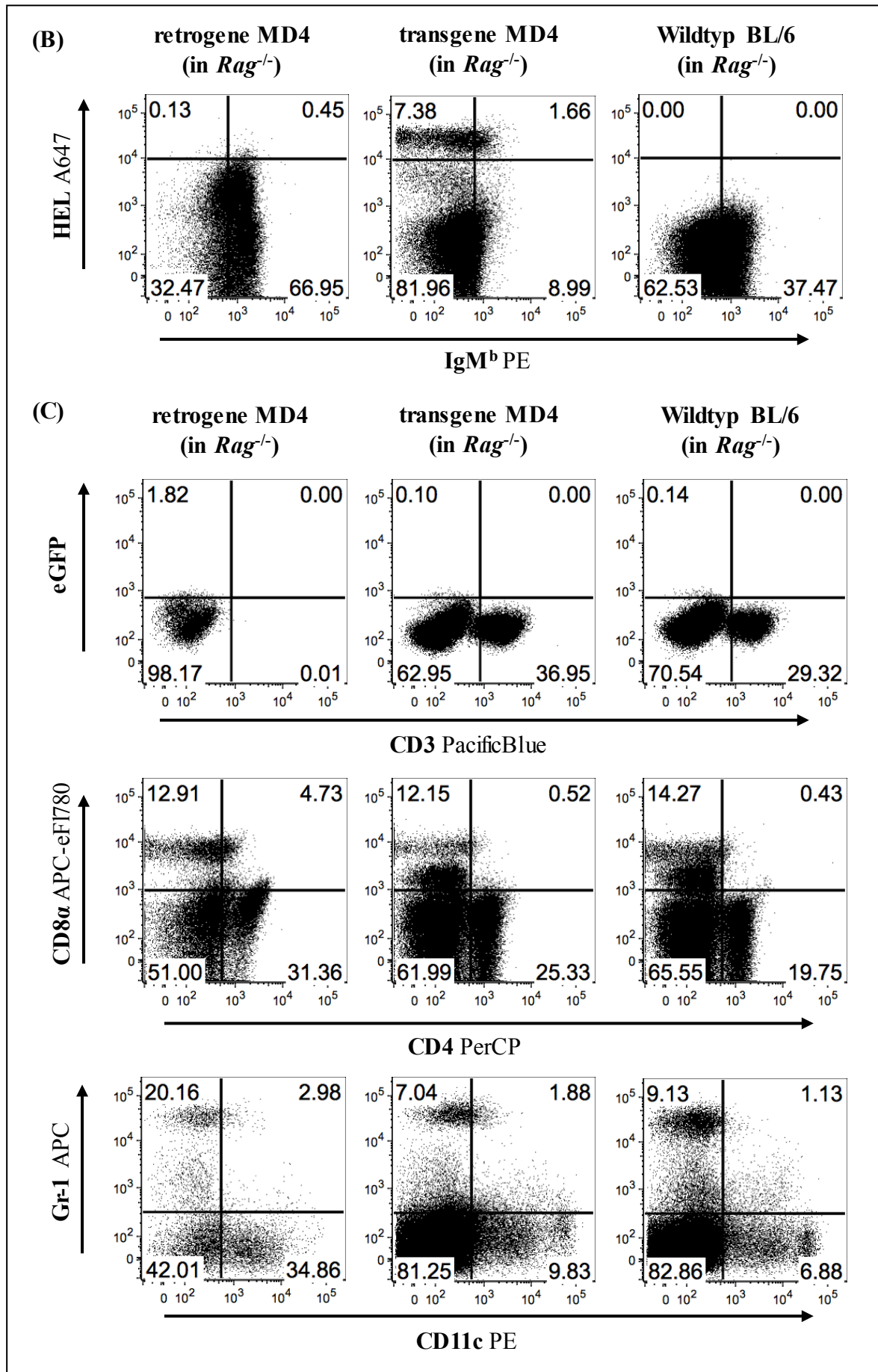


Abb. 21. Analyse der MD4 retrogenen Mäuse (*Rag*-defizient) zeigt schwache Expression des Retrogens. BZR retrogene Mäuse wurden, wie in Materialien und Methoden beschrieben, generiert. Die Analyse erfolgte

8 Wochen nach der Rekonstitution der lethal bestrahlten *Rag*^{-/-} Empfänger. Einzelzellsuspensionen von Milz, Lymphknoten, Knochenmark und Blut wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrollen dienten mit transgenen MD4 sowie mit C57BL/6 Wildtypknochenmarkszellen rekonstituierte *Rag*^{-/-} Mäuse. Repräsentativ dargestellt sind die Ergebnisse für die Milz. Tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. **(A)** Oberflächenfärbung für CD19, IgMb, das Antigen HEL und Igβ (CD79b). Transduzierte Zellen sind eGFP⁺. Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. **(B)** Intrazelluläre Färbung für dieselben Parameter wie in (A). **(C)** Oberflächenfärbung für nicht-B-Zell-Marker (CD3, CD4, CD8, CD11c, Gr-1).

Um zu überprüfen, ob der jeweilig exprimierte BZR funktional ist, wurde ein Teil der Zellen in einer weiteren Färbung mit spezifischen Antikörpern für die Komponenten des BZR-Co-Komplexes Igα und Igβ (beide konjugiert an ein Fluorochrom) inkubiert. Diese beiden Moleküle sind für eine erfolgreiche Signalweiterleitung des BZR an das Zellinnere von entscheidender Bedeutung (Dylke, Lopes et al. 2007). Exemplarisch dargestellt ist das Ergebnis für Igβ (**Abb. 21A** unten): Die Komponenten des BZR-Co-Komplexes konnten ausschließlich in den mit transgenen MD4 und den mit Wildtyp-Zellen rekonstituierten Tieren, nicht jedoch in den HEL-BZR retrogenen Tieren nachgewiesen werden. Eine effiziente Signalweiterleitung (und somit Funktionalität des BZR) ist daher nur in den Kontrolltieren gegeben, nicht jedoch in den retrogenen Tieren.

Die intrazelluläre Analyse der rekonstituierten *Rag*^{-/-} Empfänger zeigte eine sehr schwache Expression des Retrogens. Lediglich in der mitgeführten transgenen MD4-Kontrolle konnte HEL-spezifische BZR nach Inkubation mit dem an ein Fluorochrom-gekoppelten Antigen detektiert werden; in der Wildtyp-Kontrolle wurde hingegen der endogene IgM^b-BZR nachgewiesen (**Abb. 21B**).

Schließlich zeigte die Analyse von nicht-B-Zell-Markern kaum Unterschiede zwischen den retrogenen Mäusen sowie den Kontrollen. Es gab lediglich geringfügige Unterschiede in der Frequenz der CD4⁺ T-Zellen (32% in der retrogenen Maus bzw. 20 bis 25% in den Kontrollen) sowie in der Frequenz der Gr-1⁺ und CD11c⁺ Zellen (20 bzw. 34% in der BZR retrogenen Maus vgl. 7 bis 10% in den Kontrollen).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass mithilfe des optimierten Protokolls keine BZR retrogenen Mäuse generiert werden konnten, denn der gewünschte BZR (spezifisch für Lysozym, HEL) konnte ausschließlich intrazellulär, nicht jedoch auf der Oberfläche der analysierten Zellen detektiert werden.

4. DISKUSSION

4.1. Zusammenfassung

Retrogene Mäuse wurden erstmalig im Jahr 2006 von der Arbeitsgruppe von Dario A.A. Vignali für diverse T-Zell-Rezeptoren beschrieben. Durch retroviral-vermittelten Stammzellgentransfer generierten sie Mäuse, die gezielt TZR α - und TZR β -Ketten von einem multizistronischen retroviralen Vektor exprimierten (Holst, Szymczak-Workman et al. 2006, Holst, Vignali et al. 2006).

Seit ihrer ersten Beschreibung ist die Zahl der Publikationen, die die Generierung bzw. die Verwendung TZR-retrogener Mäuse beschreibt, auf über 60 angestiegen. Die retrogen exprimierten TZRs waren dabei entweder spezifisch für Modell-Antigene (z.B. OVA, *male antigen*) oder von Bedeutung bei Autoimmunität (z.B. Insulin, MOG) bzw. bei der Abwehr von Infektionen (z.B. Influenza). Weltweit konnten somit von verschiedenen Arbeitsgruppen diverse TZR-retrogene Mäuse erfolgreich generiert werden (Bettini, Bettini et al. 2012). Dies ließ die Vermutung zu, dass man (ggf. unter leichter Abwandlung des ursprünglichen Protokolls) auch BZR-retrogene Mäuse generieren könnte, die die IgH- und IgL-Ketten von einem durch ein 2A-Peptid verknüpften, multizistronischen retroviralen Vektor exprimieren. Darüber hinaus wurde in einer der ersten Publikationen über das retrogene System die Generierung BZR-retrogener Mäuse bereits als möglich angesehen (Nakagawa, Mason et al. 2006). Dies ermutigte uns analog der für T-Zell-Rezeptoren beschriebenen Methode, retrogene Mäuse zu generieren, die Glucose-6-Phosphat-Isomerase (G6PI)-spezifische BZR(s) exprimieren. Mithilfe dieser G6PI-BZR-retrogenen Mäuse sollte die Rolle der Antigen-Spezifität der B-Lymphozyten im Modell der G6PI-induzierten Arthritis näher untersucht werden. Aus eigenen Arbeiten wissen wir, dass sowohl T- als auch B-Lymphozyten für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis notwendig sind (Schubert, Maier et al. 2004, Bockermann, Schubert et al. 2005, Frey, Bruns et al. 2011). Da das verwendete Arthritis-Modell ausschließlich in den suszeptiblen Stämmen DBA/1 und SJL funktioniert und auf diesen genetischen Hintergründen keine geeigneten BZR- (bzw. TZR-)transgenen Linien existieren, erschien das retrogene System als mögliche Lösung, da sich retrogene Mäuse auf jedem genetischen Hintergrund generieren lassen (Holst, Szymczak-Workman et al. 2006).

Als Modell-BZR für die erstmalige Generierung BZR-retrogener Mäuse wurde der Lysozym-spezifische BZR MD4 gewählt. Aus der entsprechenden transgenen MD4-Linie isolierte cDNA diente in der vorliegenden Arbeit als Template für die Klonierung des rekombinanten BZR sowie später bei der Analyse der BZR-retrogenen Tiere als transgene

Kontrolle (Goodnow, Crosbie et al. 1988, Hartley, Crosbie et al. 1991, Mason, Jones et al. 1992).

4.2. *In vitro* Nachweis der vom FMDV-2A-Peptid vermittelten Spaltung

Zur Überprüfung des generierten rekombinanten BZR_s sowie der vom FMDV-2A-Peptid vermittelten Spaltung wurden *Chinese Hamster Ovary* (CHO-)Zellen mit dem für den rekombinanten BZR-kodierenden Plasmid transfiziert und die Lysate im Western Blot analysiert. Dabei konnten spezifische Banden für die Igκ- und die IgμH-Kette detektiert werden, was bedeutet, dass eine ko-translationale Spaltung durch das FMDV-2A-Peptid und/oder das Furin stattgefunden hat. Allerdings war diese Spaltung nicht vollständig, denn es wurde auch eine Bande in der Größe des ungespaltenen Produktes (~ 100 kDa) detektiert.

Die 2A-Proteasesequenz interagiert während der Translation mit dem Austrittstunnel des Ribosoms und induziert auf diese Weise das Überspringen (*skipping*) der letzten Peptidbindung am C-Terminus der 2A-Sequenz (Ryan, King et al. 1991, Donnelly, Gani et al. 1997, Halpin, Cooke et al. 1999, Donnelly, Hughes et al. 2001, Donnelly, Luke et al. 2001, de Felipe 2004). Entscheidend hierbei ist, dass das Ribosom die Translation der stromabwärts gelegenen Sequenz fortführt, nachdem es die erste (stromaufwärts gelegene) Sequenz mit der 2A-Proteasesequenz an seinem C-Terminus entlassen hat. Daher wird die 2A-Sequenz auch als CHYSEL-Sequenz (*cis-acting hydrolase element*) bezeichnet (Donnelly, Gani et al. 1997, de Felipe 2004). Von Donnelly et al. konnte gezeigt werden, dass nicht alle 2A-Peptidsequenzen mit der gleichen Spaltungseffizienz funktionieren (Donnelly, Hughes et al. 2001, Donnelly, Luke et al. 2001). Um eine maximale Spalteffizienz zu erzielen, entschieden wir uns bei der Gestaltung des retrogenen MD4 BZR-Konstrukts bewusst für die FMDV-2A-Sequenz. Vermutlich ist die Effizienz der Spaltung nicht einzig und allein von der gewählten 2A-Proteasesequenz, sondern beispielsweise auch von der stromaufwärts gelegenen Sequenz abhängig. Dies wurde von Ryan et al. bereits gezeigt (Ryan, King et al. 1991, Donnelly, Luke et al. 2001). Schließlich wird auch das gewählte Expressionssystem das Ausmaß der Spaltung beeinflussen. Donnelly et al. zufolge funktioniert die 2A-vermittelte Spaltung in allen bislang getesteten eukaryotischen Expressionssystemen (Ryan, King et al. 1991, Donnelly, Hughes et al. 2001, Donnelly, Luke et al. 2001).

Die stromaufwärts der FMDV-2A-Peptidsequenz eingefügte Furin-Spaltstelle im Konstrukt des retrogenen MD4 BZR_s bewirkt ein zweites Spaltungsereignis (in der zeitlichen Abfolge nach der vom FMDV-2A-Peptid-vermittelten Spaltung) und resultiert in einer

natürlicheren Ig μ -Kette ohne weitere Sequenzanhänge, die theoretisch eine korrekte Expression des retrogenen MD4 BZR in der Zellmembran zur Folge hätte. Furine sind zelluläre Endoproteasen, die die Aminosäure-Konsensussequenz RXRR erkennen. Sie schneiden Proteine, die diese Sequenz enthalten nach dem vierten R, sobald diese das *trans*-Golgi-Netzwerk erreichen (Thomas 2002). Zu den Substraten zählen unter anderem Wachstumsfaktoren, Serumproteine, Matrixmetalloproteinasen, Rezeptoren, virale Glykoproteine und bakterielle Exotoxine. Furine zählen zu den Typ-1-Transmembranproteinen, die ubiquitär in allen Vertebraten und vielen Invertebraten exprimiert werden (van de Ven, Voorberg et al. 1990, Roebroek, Creemers et al. 1994, Nakayama 1997).

Mithilfe des durchgeführten Western Blots, genauer gesagt bei Detektion der μ H-Kette, kann nicht unterschieden werden, ob (1) die vom FMDV-2A-Peptid vermittelte Spaltung oder (2) das vom Furin-mediierte Spaltereignis unvollständig bzw. fehlerhaft waren, da die verbliebenen Sequenzanhänge aus Furin und FMDV-2A zu klein sind, um im Western Blot (verglichen mit der vollständig gespaltenen Variante) sichtbar werden zu können. Um zu unterscheiden, ob die unvollständige Spaltung auf das FMDV-2A-Peptid oder das Furin zurückzuführen ist, könnten die nach Transfektion der CHO-Zellen erzeugten Lysate mit einem anti-2A Antiserum inkubiert werden: Eine Bande würde nur detektiert werden, wenn das vom Furin vermittelte Spaltereignis nicht stattgefunden hätte und somit das 2A-Peptid noch am C-Terminus der μ H-Kette haften würde.

Im vorliegenden Western Blot waren die Intensitäten der μ H- und der Ig κ -spezifischen Banden mit der des ungespaltenen Produktes vergleichbar, was die Vermutung nahe legt, dass gespaltene und ungespaltene Proteine in nahezu gleichen Mengen vorliegen.

Vermutlich ist die unvollständige oder fehlerhafte Spaltung nicht auf das Fehlen der Signalsequenzen der Zielsequenzen zurückzuführen. Yan et al. haben gezeigt, dass nicht nur die stromaufwärts der ersten 2A-Sequenz gelegene Zielsequenz, sondern alle Zielsequenzen eine Signalsequenz tragen sollten (Yan, Wang et al. 2010). Dies wurde bei der Klonierungsstrategie des rekombinanten MD4 BZR berücksichtigt: beide Ig-Ketten tragen eine Signalsequenz.

4.3. Expression des rekombinanten MD4 BZR in einer BZR-defizienten Zelllinie

Die Funktionalität des generierten rekombinanten MD4 BZR wurde anschließend *in vitro* durch Infektion einer *Rag*-defizienten Zelllinie, R5B, getestet. Diese Pro-B-Zelllinie besitzt keine endogene μ H-Kette, exprimiert jedoch die surrogate leichte Kette (Corfe, Gray et al.

2007). Das Einbringen einer IgH-Kette (bzw. in diesem Fall des rekombinanten MD4 BZR) resultiert in der Expression eines BZR auf der Zelloberfläche ohne dabei mit einem endogenen BZR zu konkurrieren. Nach Infektion der R5B-Zellen mit virushaltigen Überständen konnte der retrogene MD4 BZR auf der Zelloberfläche detektiert werden, nicht jedoch in den mit Kontrollüberständen (Leervektor) infizierten Zellen. Dies lässt vermuten, dass die vom FMDV-2A-Peptid und vom Furin prozessierten Spaltereignisse erfolgreich waren, die beiden Ig-Ketten danach in äquimolaren Mengen vorlagen, der Zusammenbau zum vollständigen BZR-Molekül sowie der Transport an die Zelloberfläche und die Verankerung in der Zellmembran funktioniert haben. Vor allem die Verankerung des retrogenen BZR in der Zellmembran ist ein weiteres Indiz dafür, dass die vom 2A-Peptid und Furin vermittelten Spaltereignisse (zumindest teilweise) erfolgreich waren. Denn bei inkorrektter Spaltung würden diese beiden Sequenzen am C-Terminus der HEL-spezifischen Ig μ -schweren Kette verbleiben und die korrekte Insertion in der Zellmembran verhindern. Wie bereits erwähnt, ist eine korrekte C-terminale Sequenz für die Verankerung der μ H-Kette in der Zellmembran Voraussetzung.

Mit dem erfolgreichen Nachweis der Oberflächenexpression des retrogenen BZR in einer (Pro-)B-Zelllinie *in vitro* sollte einer Expression *in vivo* theoretisch nichts entgegenstehen.

4.4. Generierung von OTII-T-Zell-Rezeptor retrogenen Mäusen

Zur Etablierung des retroviral-vermittelten Stammzelltransfers wurden zunächst TZR-retrogene Mäuse generiert, die den OTII-spezifischen T-Zell-Rezeptor exprimieren. Dieser erkennt spezifisch Hühner-Ovalbumin (Peptid 323-339) im Kontext des MHC Klasse II I-A^b Moleküls. Zur Analyse der OTII-TZR retrogenen Tiere wurde vergleichend die OTII-TZR transgene Linie hinzugenommen (Barnden, Allison et al. 1998). Der OTII-TZR konnte in den analysierten Organen der retrogenen Tiere detektiert werden, jedoch mit einer (verglichen mit den OTII-TZR transgenen Tieren) geringeren Frequenz. Eine geringere Frequenz der retrogenen verglichen mit den transgenen T-Zellen wurde bereits von Holst et al. beschrieben (Holst, Vignali et al. 2006). Verglichen mit dem transgenen System wurde von diesen Autoren ebenfalls eine allgemein geringere Frequenz der Zielzellen im retrogenen beobachtet und als Nachteil des retrogenen Systems gewertet (Holst, Szymczak-Workman et al. 2006).

Die nicht zu vernachlässigende Population an eGFP⁺CD4⁻-Zellen in den retrogenen Tieren wurde auch von Holst et al. beschrieben. Sie stellt transduzierte (und daher eGFP⁺)

Zellen dar, die jedoch nicht den CD3-Rezeptor und somit auch nicht den retrogenen TZR exprimieren und sehr wahrscheinlich in andere Zellen des hämatopoietischen Systems differenzieren (Holst, Szymczak-Workman et al. 2006).

Nachdem TZR-retrogene Mäuse erfolgreich generiert werden konnten, begannen wir mit der Generierung der MD4-BZR-retrogenen Mäuse. Dafür wurden zunächst die *in vitro*-Kulturbedingungen optimiert.

4.5. Optimierung der *in vitro* Kulturbedingungen der Donor-Knochenmarksstammzellen

Das von Holst et al. zur Infektion der Donorzellen für die Generierung TZR-retrogener Mäuse verwendete Protokoll wurde für die Generierung der BZR-retrogenen Mäuse mit dem Ziel modifiziert, die Vorläuferzellen bereits *in vitro* in die B-Zelllinie zu dirigieren. Dafür wurden unterschiedliche Zytokinkombinationen für die Kultivierung der Donorzellen vor und nach der Infektion ausgetestet. Neben den bereits von Holst et al. verwendeten IL-3, IL-6 und SCF wurde die Zugabe von IL-7 und Flt3-L analysiert.

Der Stammzellfaktor (SCF, von englisch *stem cell factor*) ist der Ligand für die Rezeptortyrosinkinase c-Kit. Die membrangebundene Isoform des SCF wird während der Hämatopoiese benötigt und scheint in der B-Zell-Entwicklung von Bedeutung zu sein, wobei angenommen wird, dass Zellen, die mSCF exprimieren als Nische für Pro- und Prä-B-Zellen fungieren (Nagasawa 2006).

Der Flt3-L (*FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*) ist der Ligand für die Rezeptortyrosinproteinkinase Flt3, die strukturelle und Sequenzähnlichkeiten mit Klasse-III-Rezeptortyrosinkinasen besitzt, zu denen unter anderem der SCF-Rezeptor c-Kit gehört. Flt3-L stimuliert synergistisch mit IL-7 das Wachstum der Prä-pro-B-Zellen (Vieira and Cumano 2004, Clark, Cooper et al. 2005, Nagasawa 2006).

IL-7 ist das erste Zytokin für das gezeigt werden konnte, dass es für die Entwicklung der Lymphozyten essentiell ist. Es induziert die Expression der *myeloid cell leukemia sequence 1* (MCL1) und vermittelt so das Überleben der B-Zell-Vorläufer. Weiterhin vermittelt die Interaktion des IL-7 mit seinem Rezeptor (IL-7R), genauer gesagt mit der IL-7R α -Kette, ein Signal, das die Rekombination der D_H- und V_H-Gensegmente in Pro-B-Zellen induziert. Das Knochenmark von IL-7- bzw. IL-7R-defizienten Tieren enthält normale Mengen an Prä-pro-B-Zellen, jedoch nur wenige Pro-, Prä- und weiter differenzierte B-Zellen. Dies zeigt die äußerst wichtige Funktion des IL-7 während des Pro-B-Zellstadiums (Dias, Silva et al. 2005, Corfe and Paige 2012, Kang and Coles 2012, Clark, Mandal et al.

2014). Von Reichman-Fried et al. konnte gezeigt werden, dass IL-7 die Proliferation in μ -transgenen SCID-Mäusen induziert. Die SCID-Mutation (*severe combined immunodeficiency mutation*) verhindert die Rekombination der Immunglobulin- und TZR-Gene in der Maus. Das Einbringen eines funktionalen, rearrangierten μ H-Kettengens in das Genom der SCID-Mäuse induzierte die Entwicklung von Pro-B-Zellen im Knochenmark dieser Mäuse (Reichman-Fried, Bosma et al. 1993).

In den hier durchgeführten Experimenten zur Optimierung der Kulturbedingungen stellte sich heraus, dass eine Kombination aus den zuvor genannten Zytokinen bzw. Wachstumsfaktoren (plus IL-3 und IL-6) die beste Transduktionsrate sowie die stärkste Proliferation der Zellen erzielte. Das Zusammenspiel und die Bedeutung von SCF, Flt3-L und IL-7 für die B-Zell-Entwicklung wurde bereits von Clark et al. thematisiert (Clark, Cooper et al. 2005).

4.6. Generierung MD4-retrogener Mäuse

Die durchflusszytometrische Analyse der BZR-retrogenen Mäuse (auf C57BL/6 Hintergrund) zeigte, dass der MD4-BZR ausschließlich intrazellulär, jedoch nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Dies konnte durch Inkubation der Proben mit dem Antigen (HEL) gekoppelt an ein Fluorochrom (Alexa-647) nachgewiesen werden. Ferner konnte durch Verwendung eines Allotyp-Antikörpers, der spezifisch die endogene IgM^b-Form erkennt, gezeigt werden, dass die analysierten retrogenen Tiere vorwiegend den endogenen BZR bzw. die endogene Ig μ -Kette auf ihrer Oberfläche ausbildeten.

Denkbar ist, dass die vom 2A-Peptid bzw. Furin mediierten Spaltereignisse *in vivo* (in den murinen Zellen) weniger effektiv waren als *in vitro* in den verwendeten Zelllinien und dies in der Konsequenz die korrekte Verankerung der MD4-spezifischen Ig μ -Kette in der Zellmembran verhindert. Gleichzeitig könnte dies auch erklären, warum der transgene, nicht jedoch der retrogene BZR zur Zelloberfläche transportiert und exprimiert wird, da die Expression dieses BZRs nicht von einer 2A-Peptid-vermittelten Spaltung abhängt.

Weiterhin könnte die entweder durch das 2A-Peptid oder das Furin verursachte unvollständige bzw. fehlerhafte Spaltung und das Ausbleiben der Oberflächenexpression des retrogenen MD4 BZRs die Existenz der detektierten chimären eGFP⁺IgM^{b+}-Zellen erklären. Dafür scheint sich die retrogene (eGFP⁺), HEL-spezifische Ig κ -Kette mit der endogenen Ig μ ^b- anstelle der retrogenen Ig μ ^a-Kette zu paaren. Um die Bildung der chimären Rezeptoren zu verhindern, wurden daher retrogene MD4 Mäuse auf dem *Rag*^{-/-} Hintergrund generiert (siehe nachfolgend).

Zur abschließenden Einschätzung der vermutlich vom FMDV-2A-Peptid oder Furin vermittelten unvollständigen bzw. fehlerhaften Spaltung des retrogenen MD4 BZR und gleichzeitig zur Optimierung des Spaltereignisses besteht zuletzt die Möglichkeit, die 2A-Peptid-Sequenz zu modifizieren: (1) Bei einer Variante könnte die Furin-Spaltstelle entfernt werden. Der direkte Vergleich zwischen beiden Konstrukten (2A-Peptid mit und ohne Furin) würde eine Aussage über die Spalteffizienz des zusätzlich eingefügten Furins erlauben. (2) Interessant wäre es auch ein Konstrukt zu generieren (und dieses vergleichend mitzuführen), bei dem die beiden Ig-Ketten über eine IRES-Sequenz verbunden sind, obwohl dies im ursprünglichen Protokoll aufgrund der verminderten Expression der stromabwärts gelegenen Zielsequenz ausgeschlossen wurde (Holst, Szymczak-Workman et al. 2006).

Ausgeschlossen werden kann vermutlich eine zu geringe Transduktionsrate der zur Rekonstitution der bestrahlten Empfänger verwendeten Zellen. Die Analyse der verwendeten Zellen zeigte Transduktionsraten zwischen 2 bis 10% eGFP⁺. Dies sind ähnliche Frequenzen zu Holst et al. Um dennoch auszutesten, ob die Transduktionsrate einen Einfluss auf die Frequenz der später detektierten retrogenen Zellen hat (und wenn ja, welchen), könnte man für die Rekonstitution ausschließlich transduzierte (eGFP⁺) Zellen verwenden. Allerdings würde man dafür eine wesentlich größere Anzahl an Spendertieren benötigen. Das derzeitige Verhältnis von Spender zu Empfänger von etwa 1:1 bis 1:2 würde sich deutlich verschieben.

Mögliche Auswirkungen der Bestrahlung auf die Rekonstitution des hämatopoietischen Systems der retrogenen Empfängermäuse können vermutlich nicht als Erklärung für den ausgebliebenen Effekt herangezogen werden. Es ist zwar bekannt, dass Stammzellen bzw. Vorläuferzellen im Knochenmark extrem anfällig für Strahlung sind (Schwartz, Neta et al. 1988, Mauch, Constine et al. 1995, Cao, Wu et al. 2010), jedoch besitzt das Knochenmark gleichzeitig Reparaturmechanismen und ein großes regeneratives Potenzial, das den Zellverlust kompensiert und die Homöostase wiederherstellt (Greenberger and Epperly 2009, Wang, Liu et al. 2010). Darüber hinaus konnten Zhou et al. zeigen, dass die für die einzelnen B-Zell-Entwicklungsstadien notwendigen funktionalen Prozesse (z.B. Umlagerung der Ig-Kettengene) selbst nach hohen Strahlendosen erhalten bleiben (Zhou, Wang et al. 2013).

Sofern technische bzw. methodische Fehler als mögliche Ursachen für die detektierte geringe Frequenz an retrogenen B-Zellen ausgeschlossen werden können, bleiben biologische bzw. intrinsische Ursachen.

Im Allgemeinen ist für eine korrekte Oberflächenexpression des BZR_s die gleichzeitige Expression der Signal-gebenden Komponenten, der Ig α - und der Ig β -Kette (CD79a und CD79b), erforderlich. Alle vier Komponenten sind für den korrekten Zusammenbau, den Transport zur Zelloberfläche sowie für die korrekte Expression in der Zellmembran essentiell (Hombach, Tsubata et al. 1990, Dylke, Lopes et al. 2007). Die Ig α -Kette des heterodimeren Signalkomplexes ist ein transmembranales Glykoprotein, das aus einem extrazellulären, einem transmembranalen sowie einem zytoplasmatischen Bereich besteht. Über einen Zysteinrest im extrazellulären Bereich wird die Ig α -Kette über eine Disulfidbindung mit der Ig β -Kette verbunden. Im zytoplasmatischen Teil der Ig α -Kette befindet sich ein hoch konserviertes *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) sowie weitere Tyrosinreste. Die Phosphorylierung der Tyrosine in den ITAMs durch *Src*-Tyrosinkinasen führt zu einer Interaktion mit der SH2-Domäne der Proteintyrosinkinase *Syk*, die in der Aktivierung diverser intrazellulärer Signalwege resultiert. Die Ig β -Kette weist eine der Ig α -Kette ähnliche Struktur auf; beide unterscheiden sich in der Anzahl der Aminosäuren, der intramolekularen Disulfidbrücken und der Glykosylierungsstellen. Schließlich besitzt die Ig β -Kette neben der ITAM keine weiteren Tyrosinreste (Dylke, Lopes et al. 2007, Herzog, Reth et al. 2009). Beide Ketten werden vom Pro-B-Zell-Stadium an bis zu ihrer terminalen Differenzierung exprimiert und sind essentiell für den Transport der Immunglobuline zur Zelloberfläche sowie für die Weiterleitung von Signalen dieser Rezeptoren an das Zellinnere. In Mäusen, die keine Ig α - oder Ig β -Ketten exprimieren, ist die B-Zell-Entwicklung im Pro-B-Zell-Stadium blockiert, obwohl die V(D)J-Rekombination und die intrazelluläre Ig μ -Expression davon nicht beeinträchtigt werden (Herzog, Reth et al. 2009). Durch die Verwendung Fluorochrom-konjugierter Antikörper spezifisch für Ig α und Ig β konnte gezeigt werden, dass diese Moleküle auf der Zelloberfläche der analysierten retrogenen Tiere (auf C57BL/6 Wildtyp-Hintergrund) exprimiert werden. Daher kann die fehlende Oberflächenexpression des retrogenen BZR_s in den analysierten Wildtyp-Mäusen nicht auf die fehlende Expression der Ig α - und Ig β -Ketten zurückgeführt werden. In den retrogenen *Rag*^{-/-} Mäusen konnten die Signal-gebenden Komponenten nicht nachgewiesen werden. Hier lässt sich abschließend nicht beurteilen, ob die fehlende Oberflächenexpression des retrogenen BZR_s sowie der Signal-gebenden Komponenten auf mechanistische Ursachen wie eine unvollständige Spaltung durch das 2A-Peptid bzw. Furin zurückzuführen ist.

Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse (auf C57BL/6-Hintergrund) zeigte, dass sich (teilweise) chimäre Rezeptoren, bestehend aus der retrogenen (eGFP⁺) leichten und der

endogenen schweren Kette (IgM^{b+}), gebildet haben. Um die Bildung dieser chimären Rezeptoren auszuschließen, wurden anstelle von Wildtyp-Mäusen *Rag*^{-/-}-Mäuse als Spender und als Empfänger des retrogen transduzierten Knochenmarks verwendet. Entgegen unseren Erwartungen konnte der retrogene BZR auch hier in nur sehr geringer Frequenz in den analysierten lymphatischen Organen detektiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass *in vivo* für den Transport des B-Zell-Rezeptors zur Zelloberfläche andere Mechanismen verwendet werden als in der Rag-defizienten Zelllinie R5B, wo die Oberflächenexpression des retrogenen MD4 BZRs erfolgreich demonstriert werden konnte.

Mitunter wäre es aufschlussreich, in den BZR-retrogenen Mäusen das Entwicklungsstadium zu identifizieren, ab dem Veränderungen in der Expression des (Prä-)BZRs – verglichen mit der „natürlichen“ Expression – auftreten. Dafür könnte man die Repopulation des hämatopoietischen Systems der Empfängertiere näher untersuchen, beispielsweise die sog. HARDY-Fraktionen analysieren (Hardy 1990, Hardy 1991, Hardy, Li et al. 2000). Die HARDY-Fraktionen, benannt nach Richard R. Hardy, beschreiben – basierend auf der Expression von B220 sowie der weiteren Oberflächenmarker – die einzelnen B-Zell-Vorläuferstadien im Knochenmark. Mit den daraus gewonnenen Erkenntnissen könnten gegebenenfalls das für den rekombinanten BZR-kodierende Konstrukt mit dem Ziel modifiziert werden, die ungehinderte Entwicklung der Zellen zu ermöglichen. Darüber hinaus könnten die Signal-gebenden Komponenten Igα und Igβ ko-transduziert werden, wie es auch von Holst et al. für den TZR und den CD3-Komplex vorgeschlagen wurde (Holst, Szymczak-Workman et al. 2006).

Eine weitere Ursache für die beobachtete geringe(re) Frequenz des retrogen exprimierten BZRs (verglichen mit dem TZR) könnte in der Wahl des Rezeptors (und somit seiner Spezifität) selbst liegen. Holst et al. haben berichtet, dass die mit dem retrogenen System erzielten Ergebnisse je nach Spezifität des gewählten TZR variieren können, in Abhängigkeit davon, ob zentrale oder periphere Toleranzmechanismen induziert werden. Die Expression von potenziell autoreaktiven TZR könne dabei zur Deletion der Thymozyten, der Herunterregulierung des TZR oder/und der CD4/CD8-Co-Rezeptoren führen. Sie empfehlen für diesen Fall eine Modifikation der TZR-2A-Proteasesequenz, die die Selektion bzw. Deletion autoreaktiver TZR beeinflussen könnte (Holst, Szymczak-Workman et al. 2006). Prinzipiell ist die Toleranzinduktion – wie soeben für retrogene TZR – auch im Falle des retrogenen BZRs möglich. Allerdings stellt sich dann die Frage, warum der transgene MD4 BZR in den Kontrolltieren exprimiert wurde, nicht jedoch der retrogene MD4 BZR? Vorausgesetzt, der in den retrogenen Tieren beobachtete Effekt ist tatsächlich auf

die Induktion von Toleranz zurückzuführen, so lässt dies vermuten, dass die Toleranz nicht gegen das Lysozym, sondern beispielsweise gegen die 2A-Proteasesequenz oder das von den transduzierten Zellen exprimierte eGFP gerichtet ist und sie infolgedessen negativ selektioniert werden. In den Lysozym-transgenen Linien kommt es zur Toleranzinduktion sobald das Lysozym als Neo-Autoantigen co-exprimiert wird (Goodnow, Crosbie et al. 1988, Goodnow, Crosbie et al. 1989, Hartley and Goodnow 1994). Je nachdem, ob das Lysozym als lösliches oder membranständiges Antigen exprimiert wird, induziert dies Anergie bzw. die negative Selektion und damit die Eliminierung der Zellen (Hartley, Crosbie et al. 1991, Mason, Jones et al. 1992).

Bell und Goodnow konnten weiterhin zeigen, dass die IgM-Oberflächenexpression in den toleranten B-Zellen drastisch reduziert waren (obwohl die mRNA-Level unverändert waren) und dies auf einen gestörten Transport vom ER zum Golgi zurückzuführen sei (Bell and Goodnow 1994).

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit ein optimiertes Protokoll zur Generierung BZR-retrogener Mäuse verwendet, das von unserem, aber auch von anderen Laboren erfolgreich für die Generierung TZR-retrogener Mäuse genutzt wurde. In den analysierten Tieren wurde der retrogene BZR vorwiegend intrazellulär detektiert. Die Oberflächenexpression des retrogenen BZR konnte ausschließlich in der für die *in vitro* Versuche verwendeten *Rag*-defizienten Pro-B-Zelllinie R5B nachgewiesen werden, nicht jedoch *in vivo* in den analysierten *Rag*^{-/-} oder Wildtyp-Mäusen. Basierend auf den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen und der Tatsache, dass bislang keine Publikation die Generierung BZR-retrogener Mäuse beschreibt, scheint dies nicht der geeignete Ansatz zur *in vivo* Expression eines B-Zell-Rezeptors zu sein, obwohl das zugrundeliegende Protokoll erfolgreich für die *in vivo* Expression anderer Rezeptoren (beispielsweise TZR) genutzt wurde.

4.7. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation geben Grund zur Annahme, dass der gewählte retrogene Ansatz zur Expression von B-Zell-Rezeptoren *in vivo* nicht geeignet scheint. Um dennoch die Rolle Antigen-spezifischer B-Lymphozyten im Modell der G6PI-induzierten Arthritis zu untersuchen, und das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit zu erreichen, könnte auf das von Pizzolla et al. publizierte G6PI-Peptid-induzierte Arthritismodell in C57BL/10 zurückgegriffen und damit auf diesem genetischen Hintergrund auf konventionelle Weise G6PI-BZR-transgene Mäuse generiert werden (Pizzolla, Wing et al. 2013). Die C57BL/10-Linie (B10) ist ein Substamm der C57BL-Linie und hat den gleichen Ur-

sprung wie die C57BL/6-Linie. Sie sind ebenfalls eine wertvolle Linie für die immunologische Forschung. In dem von Pizolla et al. entwickelten G6PI-Peptid-basierten Modell führt die einmalige intradermale Immunisierung mit huG6PI₃₂₅₋₃₃₉ emulgiert in CFA zur Arthritisinduktion in B10.Q (H-2^q) und B10.P (H-2^p-Haplotyp). Diese ist sowohl von T- als auch B-Lymphozyten sowie MHCII und der Komplementkomponente C5 abhängig; Autoantikörper spielen hingegen keine Rolle. Letzteres hätte zur Konsequenz, dass die Bedeutung der Autoantikörper produzierenden G6PI-spezifischen B-Zellen nicht untersucht werden könnte, lediglich die Rolle G6PI-spezifischer B-Lymphozyten als professionelle APCs sowie ihre Funktion als Zytokinproduzenten. Sequenzinformationen für die Klonierung der G6PI-spezifischen BZRs könnten aus G6PI-spezifischen B-Zellhybridomen unterschiedlicher Affinitäten gewonnen und die Sequenzinformation für das lösliche Ig gegen die membranständige Variante ausgetauscht werden. Darüber hinaus bestünde die Möglichkeit, auf herkömmliche Weise G6PI-BZR-transgene Mäuse auf den für das G6PI-Proteinsuszeptiblen Hintergründen DBA/1 und SJL zu generieren.

ANHANG

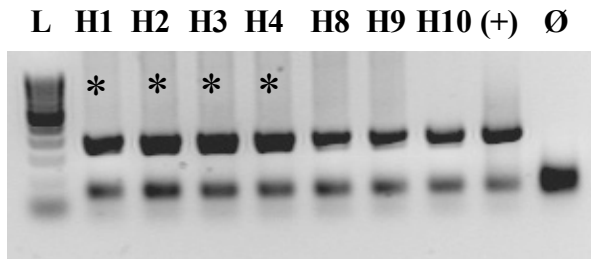
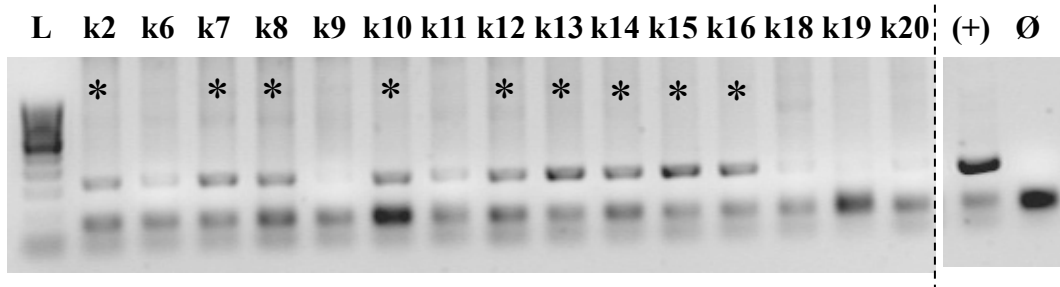
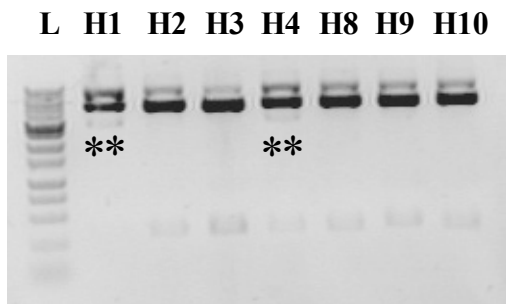
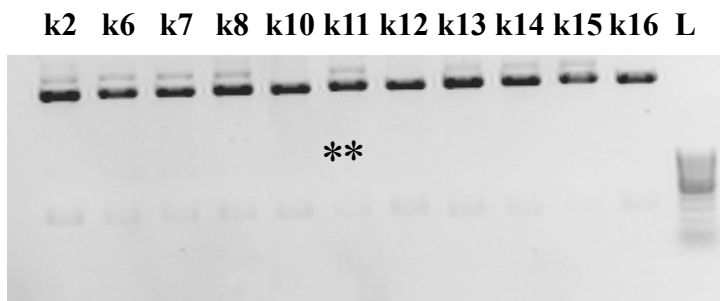
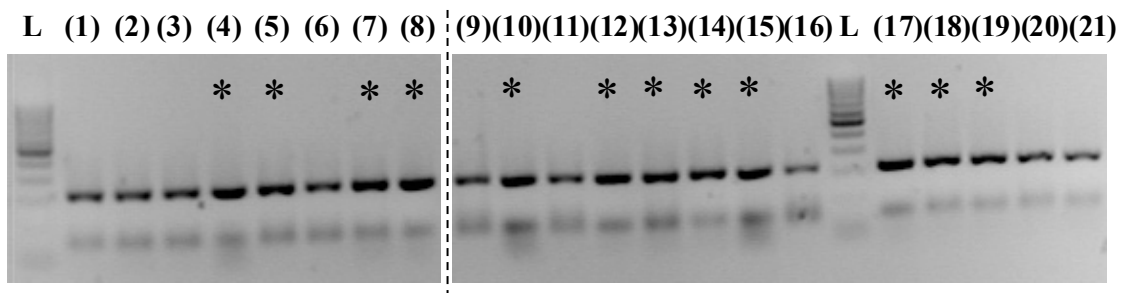
(A) Amplifizierung des IgV_H-Bereichs(B) Amplifizierung des IgV_k-Bereichs(C) *Eco*RI-Restriktionsverdau der IgV_H-Klone(D) *Eco*RI-Restriktionsverdau der IgV_k-Klone

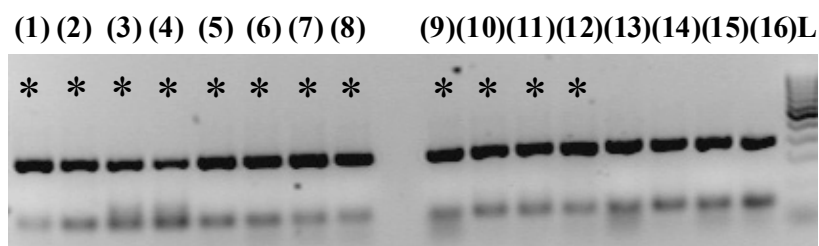
Abb. A1. Screen der Transformanten nach 5'*Nested* RACE. Die nach 5'*Nested* RACE für die IgV_H- und die IgV_k-Kette erhaltenen Produkte wurden aus dem Gel aufgereinigt, in pCR4® (TOPO TA Vektor, LIFE TECHNOLOGIES) ligiert und in chemisch kompetente *E.coli* DH5α transformiert. Die nach Ausstreichen der Transformationsansätze auf LB-Amp-Platten erhaltenen Kolonien wurden zunächst in einer PCR überprüft. (A) ColonyPCR zur Amplifizierung der IgV_H10- (5'JF_32 und 3'JF_33; T_{Anneal} = 53°C; t_{Elong} = 30 sek; ~ 290

bp) und **(B)** IgV_κ23-Domäne (5'JF_34 und 3'JF_35; T_{Anneal} = 58°C; t_{Elong} = 30 sek; ~ 220 bp). In (A) und (B) ist das Ergebnis nach Gelelektrophorese gezeigt (2% Agarosegel); es wurde die *Gene Ruler Low Range DNA Ladder* (FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC) verwendet. Als Positivkontrollen (+) diente aus dem Hybridom HyHEL-10 isolierte cDNA; dH₂O wurde als Negativkontrolle verwendet. Nach ColonyPCR erhaltene positive Klone (gekennzeichnet mit *) wurden im analytischen Restriktionsverdau eingesetzt. **(C)** und **(D)** Dargestellt ist das Ergebnis des *EcoRI*-Restriktionsverdaus nach erfolgter Gelelektrophorese (1% Agarosegel) für die 5'IgV_H- (C) und 5'IgV_κ-Klone (D). Von ausgewählten Klonen (markiert mit **) wurde die Sequenz analysiert (AGOWA/LGC GENOMICS, Berlin).

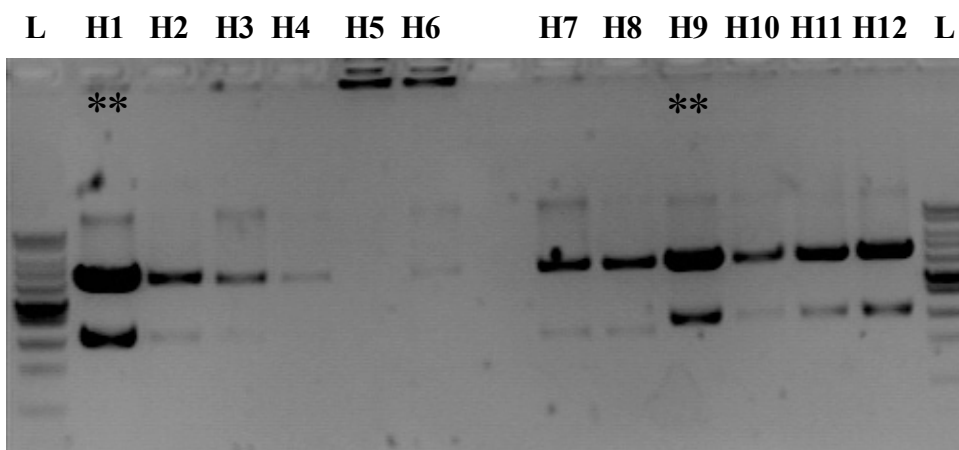
(A) Amplifizierung des IgV_H-Bereichs



(B) Amplifizierung des IgV_K-Bereichs



(C) *Eco*RI-Restriktionsverdau IgV_H-Klone



(D) *Eco*RI-Restriktionsverdau IgV_K-Klone

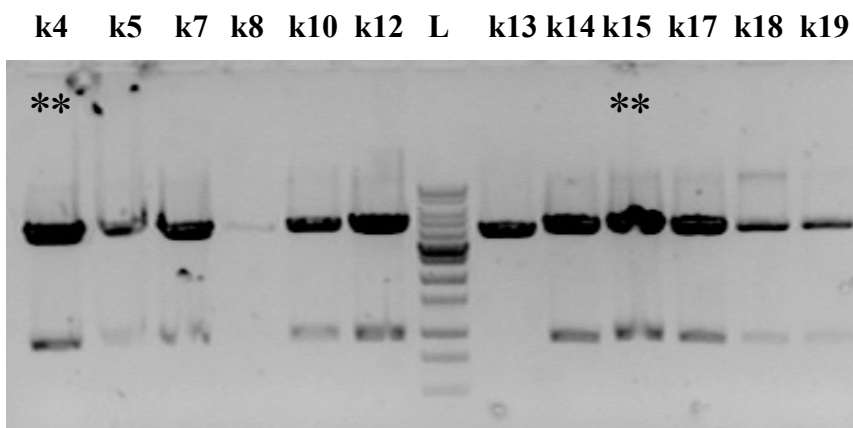


Abb. A2. Screen der Transformanten nach 3'RACE. Die nach 3'RACE für die IgV_H- und die IgV_K-Kette erhaltenen Produkte wurden aus dem Gel aufgereinigt, in pCR4® (TOPO TA Vektor, LIFE TECHNOLOGIES) ligiert und in chemisch kompetente *E.coli* DH5α transformiert. Die nach Ausstreichen der Transformationsansätze auf LB-Amp-Platten erhaltenen Kolonien wurden zunächst in einer PCR überprüft. **(A)** ColonyPCR zur Amplifizierung der IgV_H10- (5'JF_32 und 3'JF_33; T_{Anneal} = 53°C; t_{Elong} = 30 sek; ~ 290 bp) und **(B)** IgV_K23-Domäne (5'JF_34 und 3'JF_35; T_{Anneal} = 58°C; t_{Elong} = 30 sek; ~ 220 bp). In (A) und (B) ist das Ergebnis nach Gelelektrophorese gezeigt (2% Agarosegel); es wurde die *Gene Ruler Low Range DNA Ladder* (FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC) verwendet. Als Positivkontrollen (+) diente aus dem Hybridom HyHEL-10 isolierte cDNA; dH₂O wurde als Negativkontrolle verwendet. Nach ColonyPCR erhaltene positive Klone (geennzeichnet mit *) wurden im analytischen Restriktionsverdau eingesetzt. **(C)** und **(D)** Dargestellt ist das Ergebnis des *EcoRI*-Restriktionsverdaus nach erfolgter Gelelektrophorese (1% Agarosegel) für die 5'IgV_H- (C) und 5'IgV_K-Klone (D). Von ausgewählten Klonen (markiert mit **) wurde die Sequenz analysiert (AGOWA/LGC GENOMICS, Berlin).

1	10	20	30	40	50	60
ATGATGGTGT	TAAGTCTTCT	GTACCTGTTG	ACAGCCCTTC	CGGGTATCCT	GTCAGACGTG	
IgVH						»»
70	80	90	100	110	120	
CAGCTTCAGG	AGTCAGGACC	TAGCCTCGTG	AAACCTTCTC	AGACTCTGTC	CCTCACCTGT	
IgVH						»»
130	140	150	160	170	180	
TCTGTCACTG	GCGACTCCAT	CACCAGTGA	TATTGGAGCT	GGATCCGGAA	ATTCCCAGGG	
IgVH						»»
190	200	210	220	230	240	
AATAGACTTG	AGTACATGGG	GTACGTAAGC	TACAGTGGA	GCACGTACTA	CAATCCATCT	
IgVH						»»
250	260	270	280	290	300	
CTCAAAAGTC	GAATCTCCAT	CACTCGAGAC	ACATCCAAGA	ATCAGTACTA	TCTGGACCTG	
IgVH						»»
310	320	330	340	350	360	
AATTCTGTGA	CTACTGAGGA	CACAGCCACA	TATTACTGTG	CAAACCTGGGA	CGGTGATTAC	
IgVH						»»
370	380	390	400	410	420	
TGGGGCCAAAG	GGACTCTGGT	CACTGTCTCT	TGCAGAGAGTC	AGTCCTTCCC	AAATGTCTTC	
IgVH			IgCH			»»
430	440	450	460	470	480	
CCCCTCGTCT	CCTGCGAGAG	CCCCCTGTC	TGATAAGAA	TGGTGGCCAT	GGGCTGCCTG	
IgCH						»»
490	500	510	520	530	540	
GGCCGGGACT	TCCTGCCAG	CACCATTTC	TTCACTTGG	ACTACAGAA	CAACACTGAA	
IgCH						»»
550	560	570	580	590	600	
GTCATCCAGG	GTATCAGAAC	CTTCCCCAAC	CTGAGGACAG	GGGGCAAGTA	CCTAGCCACC	
IgCH						»»
610	620	630	640	650	660	
TCGCAGGTGT	TGCTGTCTCC	CAAGAGCATC	CTTGAAGGTT	CAGATGAATA	CCTGGTATGC	
IgCH						»»
670	680	690	700	710	720	
AAAAATCCACT	ACGGAGGCAA	AAACAGAGAT	CTGCATGTGC	CCATTCCAGC	TGTCGCAGAG	
IgCH						»»
730	740	750	760	770	780	
CGCAAGTCTA	AACTCATCTG	CGAGGCCACG	AACCTTCACTC	CAAAACTGAT	CACAGTATCC	
IgCH						»»
790	800	810	820	830	840	
TGGCCTAAAG	ACGGGAAATT	AGTGGAGTCT	GGGTTTACGA	CGGACCCGGT	GACGATAGAG	
IgCH						»»
850	860	870	880	890	900	
AACAAAGGGT	CTACGCCGCA	AACGTATAAA	GTGATATCTA	CGTTAACGAT	ATCTGAGATA	
IgCH						»»
910	920	930	940	950	960	
GACTGGTTAA	ACTTAAACGT	GTATACGTGT	AGGGTGGACC	ACAGGGGGTT	AACGTTTTTA	
IgCH						»»
970	980	990	1,000	1,010	1,020	
AAAAACGTGT	CTTCTACGTG	TGCGGCGTCT	CCGTCTACGG	ACATATTAAC	GTTTACGATA	
IgCH						»»
1,030	1,040	1,050	1,060	1,070	1,080	
CCCCCTCCT	TGCGGACAT	CTTCCTCAGC	AAGTCCGCTA	ACCTGACCTG	TCTGGTCTCA	
IgCH						»»
1,090	1,100	1,110	1,120	1,130	1,140	
AACCTGGCAA	CCTATGAAAC	CCTGAATATC	TCCTGGGCTT	CTCAAAGTGG	TGAACCACTG	
IgCH						»»
1,150	1,160	1,170	1,180	1,190	1,200	

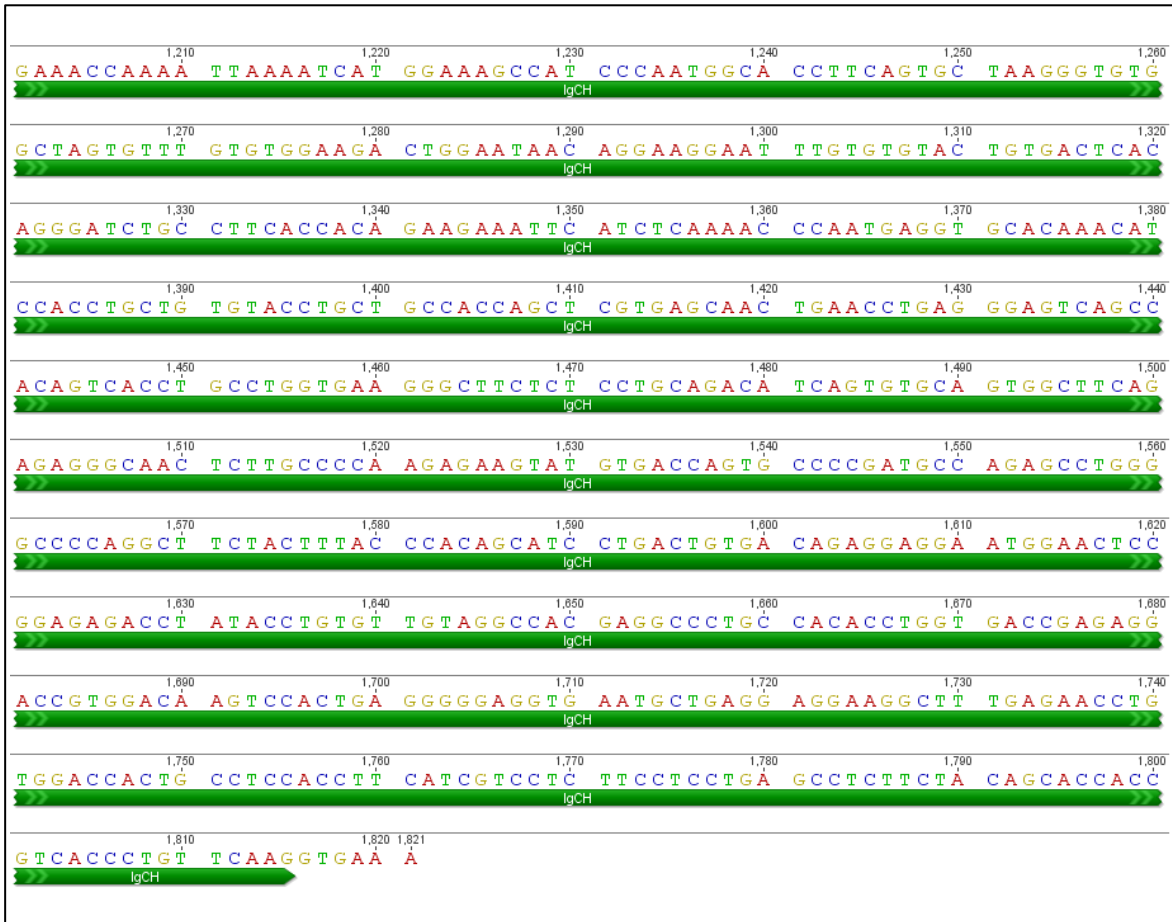


Abb. A3. *In silico* generierte *full length* Sequenz für die Lysozym-spezifische IgH-Kette. Die für die IgH-Kette nach 5'*Nested*- und nach 3'RACE erhaltenen Sequenzinformationen wurden *in silico* zu einer *full length* Sequenz zusammengefügt (*Geneious Pro*TM Software, Version 5.3). Basierend auf dieser Sequenzinformationen wurden Primer für die Generierung von IgH *full length* Klonen entworfen.



Abb. A4. *In silico* generierte full length Sequenz für die Lysozym-spezifische Igκ-Kette. Die für die Igκ-Kette nach 5'*Nested*- und nach 3'RACE erhaltenen Sequenzinformationen wurden *in silico* zu einer full length Sequenz zusammengefügt (*Geneious Pro™ Software*, Version 5.3). Basierend auf dieser Sequenzinformationen wurden Primer für die Generierung von Igκ full length Klonen entworfen.

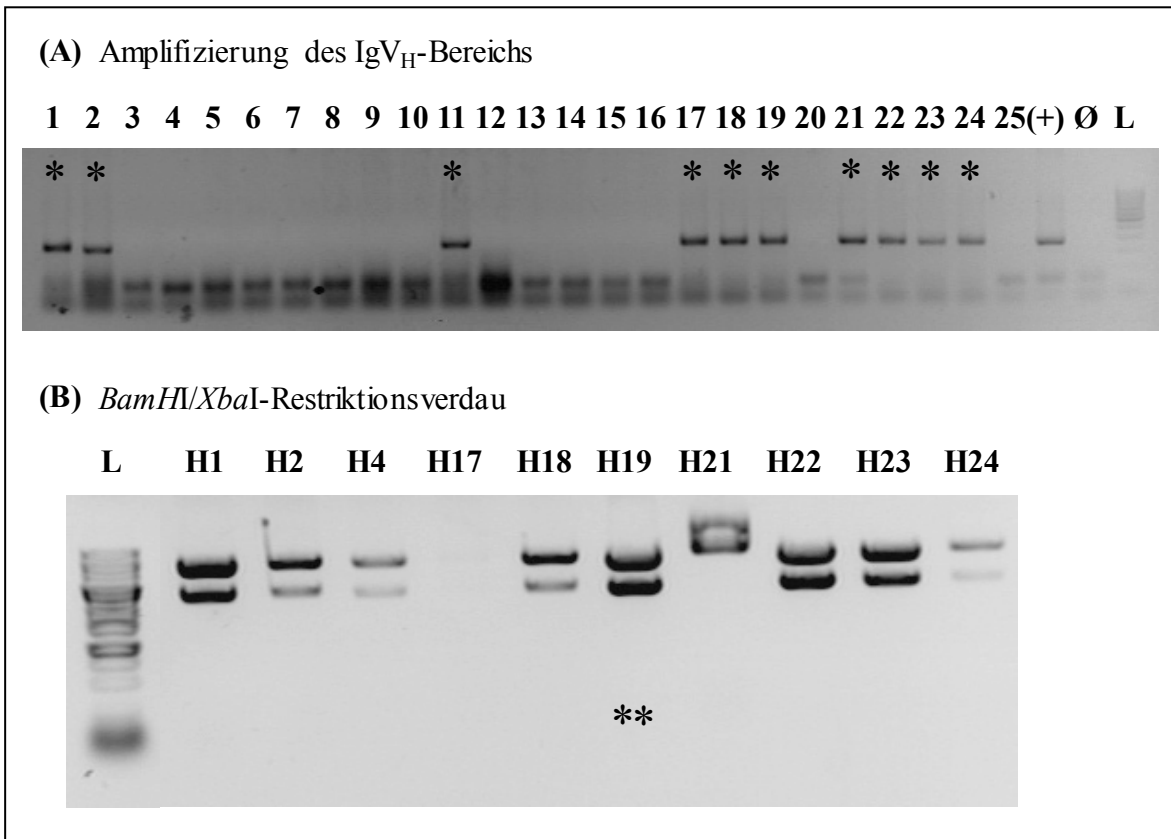


Abb. A5. Screen der Transformanten zur Identifizierung von *full length* Ig μ _{mem}-Klonen. Die nach PCR (5'JF_50 und 3'JF_51) erhaltenen Produkte wurden mithilfe des *Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System Kit* (PROMEGA) aus dem Gel aufgereinigt, in den TOPO TA Vektor pCR®II (LIFE TECHNOLOGIES) ligiert und in kompetente *E.coli* DH5 α transformiert. Die nach Ausstreichen der Transformationsansätze auf LB-Amp-Platten erhaltenen Kolonien wurden zunächst in einer PCR überprüft. **(A)** ColonyPCR zur Amplifizierung der IgV_H10-Domäne (5'JF_32 und 3'JF_33; T_{Anneal} = 53°C; t_{Elong} = 30 sek; ~ 290 bp). Gezeigt ist das Ergebnis nach Gelelektrophorese (2% Agarosegel); es wurde die *Gene Ruler Low Range DNA Ladder* (FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC) verwendet. Als Positivkontrolle (+) diente DNA des aufgereinigten und für die TOPO TA Klonierung verwendeten PCR-Produktes; dH₂O wurde als Negativkontrolle verwendet. Nach ColonyPCR erhaltene positive Klone (gekennzeichnet mit *) wurden im analytischen Restriktionsverdau eingesetzt. **(B)** Dargestellt ist das Ergebnis des *Bam*HI/*Xba*I-Restriktionsverdaus nach erfolgter Gelelektrophorese (1% Agarosegel; 1 kb DNA-Leiter, GENE CRAFT). Von ausgewählten Klonen (markiert mit **) wurde die Sequenz analysiert (AGOWA/LGC GENOMICS, Berlin).

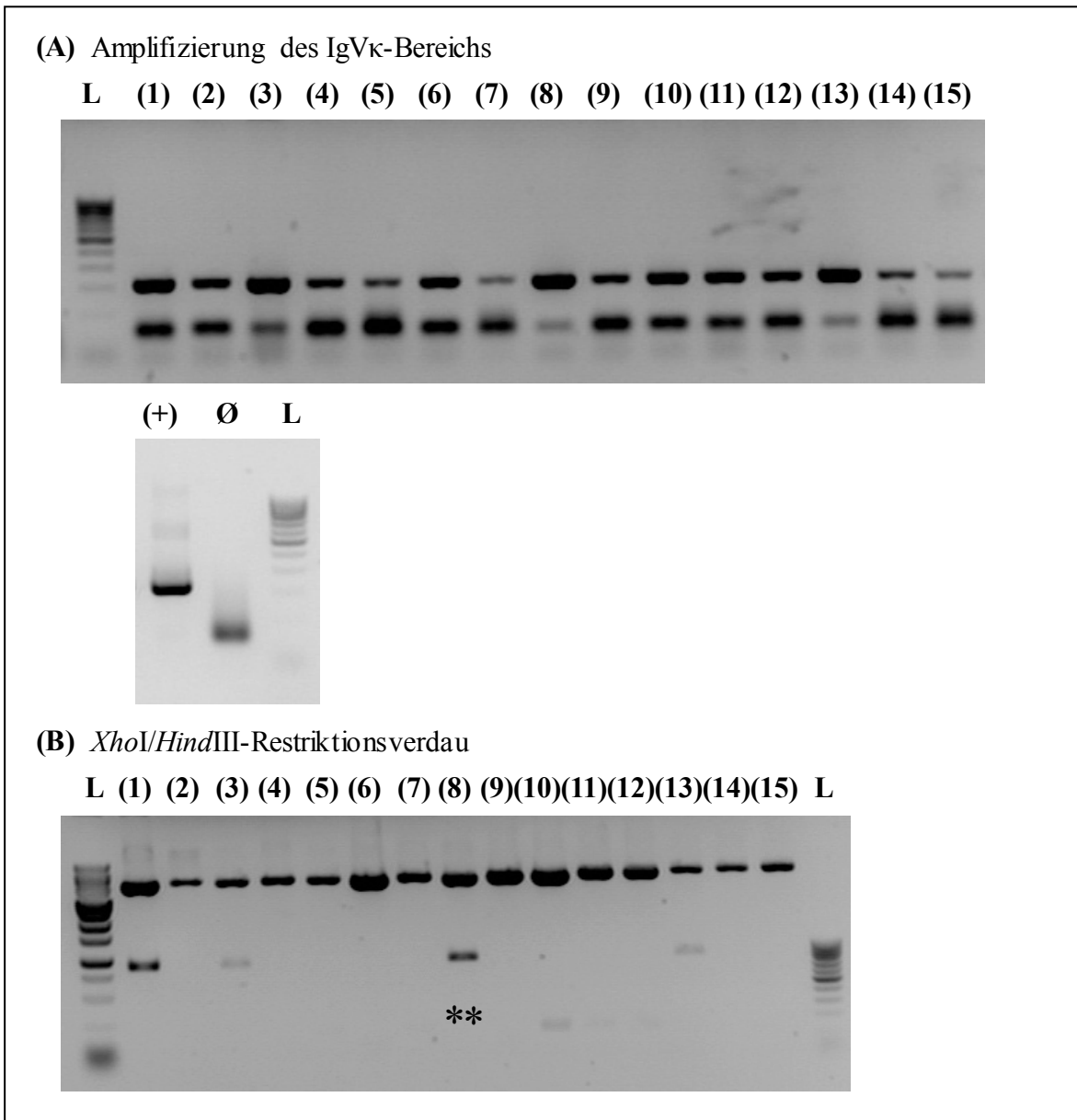


Abb. A6. Screen der Transformanten zur Identifizierung von Ig κ full length Klonen. Die nach PCR (5'JF_48 und 3'JF_49) erhaltenen Produkte wurden mithilfe des *Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System Kit* (PROMEGA) aus dem Gel aufgereinigt, in den TOPO TA Vektor pCR®II (LIFE TECHNOLOGIES) ligiert und in kompetente *E.coli* DH5 α transformiert. Die nach Ausstreichen der Transformationsansätze auf LB-Amp-Platten erhaltenen Kolonien wurden zunächst in einer PCR überprüft. **(A)** ColonyPCR zur Amplifizierung der IgV κ 23-Domäne (5'JF_34 und 3'JF_35; $T_{\text{Anneal}} = 58^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{Elong}} = 30$ sek; ~ 220 bp). Gezeigt ist das Ergebnis nach Gelelektrophorese (2 % Agarosegel); es wurde die *Gene Ruler Low Range DNA Ladder* (FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC) verwendet. Als Positivkontrolle (+) diente DNA des aufgereinigten und für die TOPO TA Klonierung verwendeten PCR-Produktes; dH₂O wurde als Negativkontrolle verwendet. Nach ColonyPCR erhaltene positive Klone (gekennzeichnet mit *) wurden im analytischen Restriktionsverdau eingesetzt. **(B)** Dargestellt ist das Ergebnis des *XhoI/HindIII*-Restriktionsverdaus nach erfolgter Gelelektrophorese (1% Agarosegel; 1 kb DNA-Leiter, GENE CRAFT). Von ausgewählten Klonen (markiert mit **) wurde die Sequenz analysiert (AGOWA/LGC GENOMICS, Berlin).

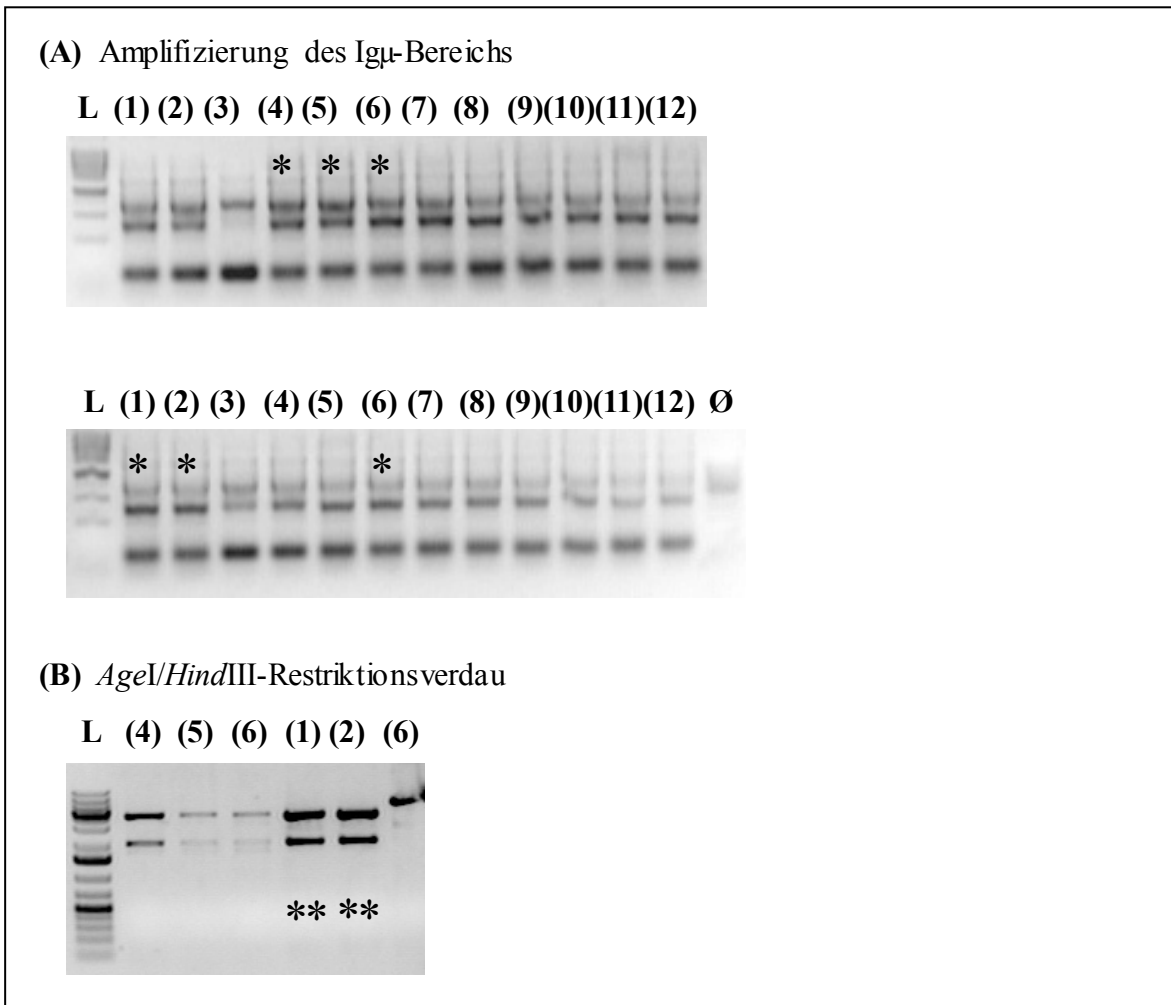


Abb. A7. Screen der Transformanten nach Anfügen der Furin-FMDV-2A-Proteasesequenz an die *full length* I μ _{mem}-Kette. Die nach PCR (5'JF_66 und 3'JF_67) erhaltenen Produkte wurden mithilfe des *Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System Kit* (PROMEGA) aus dem Gel aufgereinigt, in den TOPO TA Vektor pCR®II (LIFE TECHNOLOGIES) ligiert und in kompetente *E.coli* DH5 α transformiert. Die nach Ausstreichen der Transformationsansätze auf LB-Amp-Platten erhaltenen Kolonien wurden zunächst in einer PCR überprüft. **(A)** ColonyPCR zur Amplifizierung der I μ -Domäne (5'JF_42 und 3'JF_44; T_{Anneal} = 60°C; t_{Elong} = 45 sek; ~ 400 bp). Gezeigt ist das Ergebnis nach Gelelektrophorese (2 % Agarosegel); es wurde die *Gene Ruler Low Range DNA Ladder* (FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC) verwendet. Als Negativkontrolle wurde dH₂O verwendet. Nach ColonyPCR erhaltene positive Klone (gekennzeichnet mit einem *) wurden im analytischen Restriktionsverdau eingesetzt. **(B)** Dargestellt ist das Ergebnis des *AgeI/HindIII*-Restriktionsverdaus nach erfolgreicher Gelelektrophorese (1% Agarosegel; *Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder*, FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC). Von ausgewählten Klonen (markiert mit **) wurde die Sequenz analysiert (AGOWA/LGC GENOMICS, Berlin).

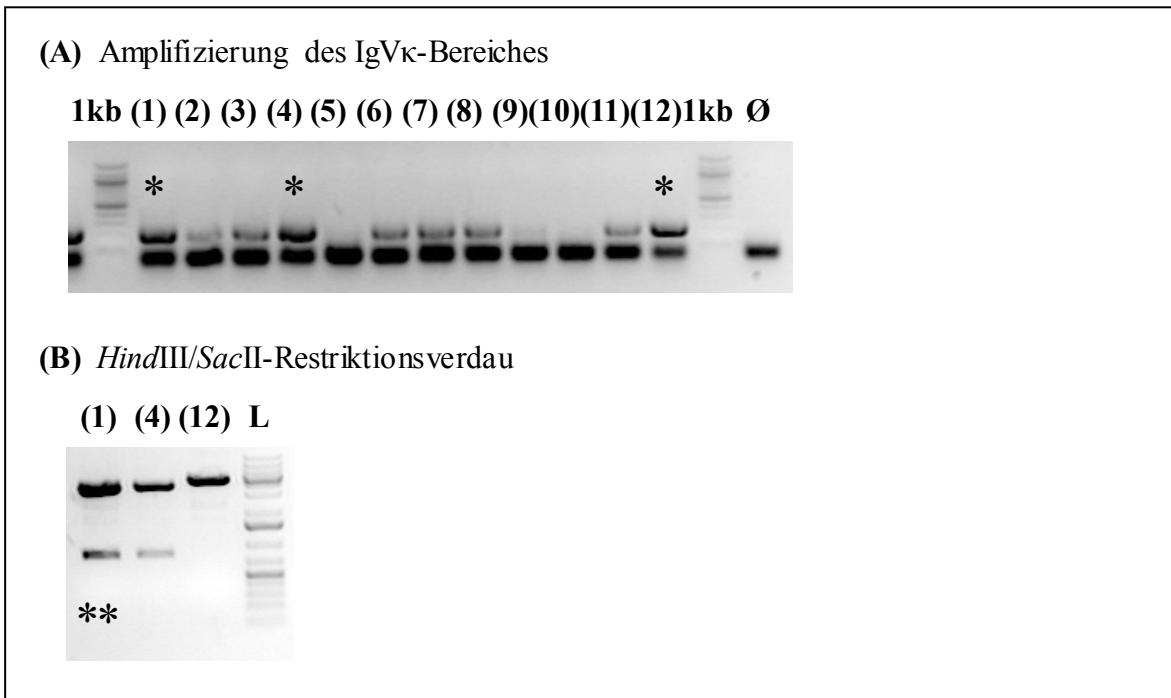


Abb. A8. Screen der Transformanten nach Anfügen der FMDV-2A-Proteasesequenz an die *full length* Ig κ -Kette. Die nach PCR (5'JF_68 und 3'JF_69) erhaltenen Produkte wurden mithilfe des *Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System Kit* (PROMEGA) aus dem Gel aufgereinigt, in den TOPO TA Vektor pCR®II ligiert (LIFE TECHNOLOGIES) und in kompetente *E.coli* DH5 α transformiert. Die nach Ausstreichen der Transformationsansätze auf LB-Amp-Platten erhaltenen Kolonien wurden zunächst in einer PCR überprüft. **(A)** ColonyPCR zur Amplifizierung der IgV κ 23-Domäne (5'JF_34 und 3'JF_35; $T_{\text{Anneal}} = 58^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{Elong}} = 30$ sek; ~ 220 bp). Gezeigt ist das Ergebnis nach Gelelektrophorese (2% Agarosegel); es wurde die *Gene Ruler Low Range DNA Ladder* (FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC) verwendet. Als Negativkontrolle wurde dH₂O verwendet. Nach ColonyPCR erhaltene positive Klone (gekennzeichnet mit *) wurden im analytischen Restriktionsverdau eingesetzt. **(B)** Dargestellt ist das Ergebnis des *Hind*III/*Sac*II-Restriktionsverdaus nach erfolgter Gelelektrophorese (1% Agarosegel; *Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder*, FERMENTAS/THERMO SCIENTIFIC). Von einem ausgewählten Klon (markiert mit **) wurde die Sequenz analysiert (AGOWA/LGC GENOMICS, Berlin).

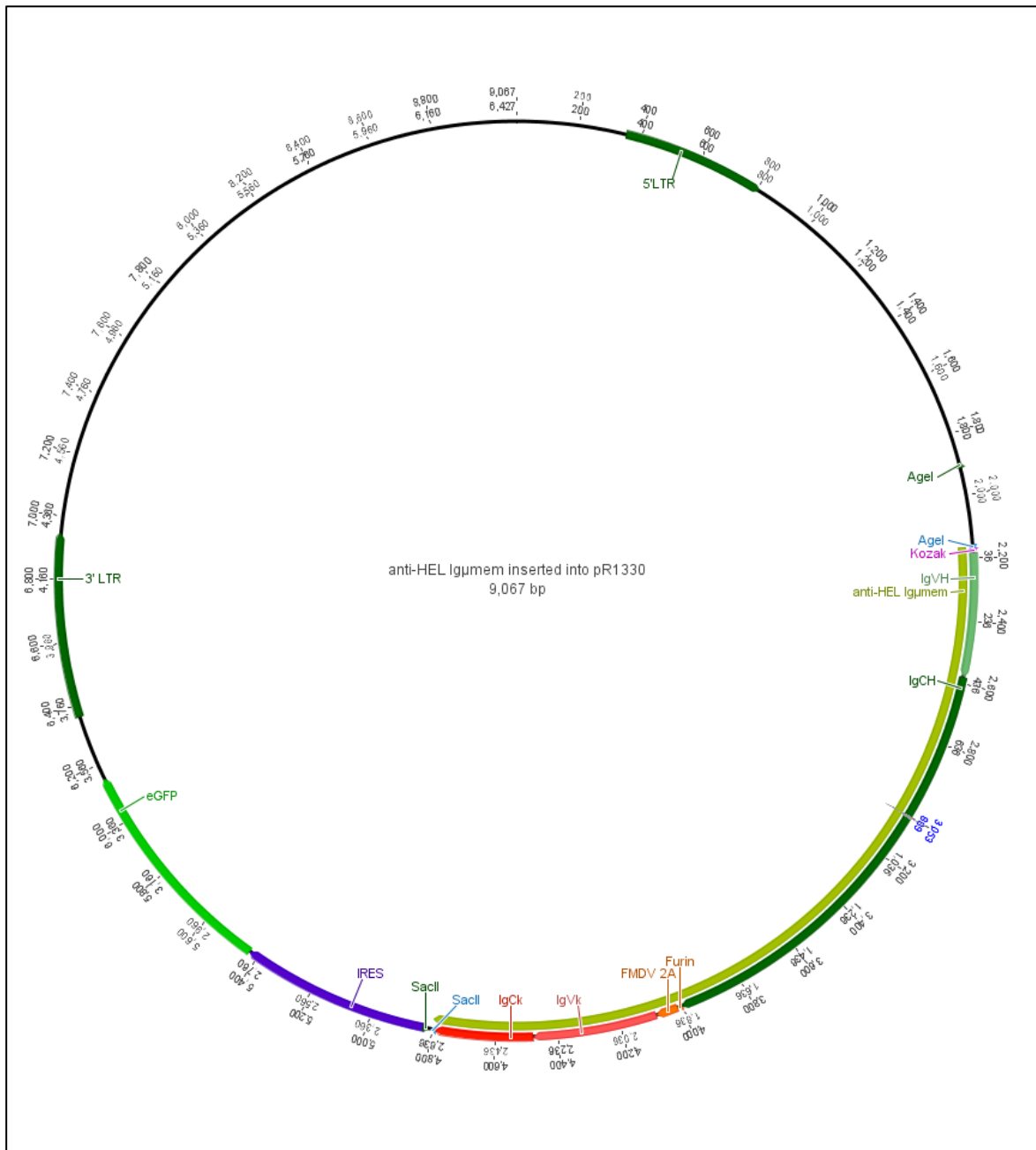
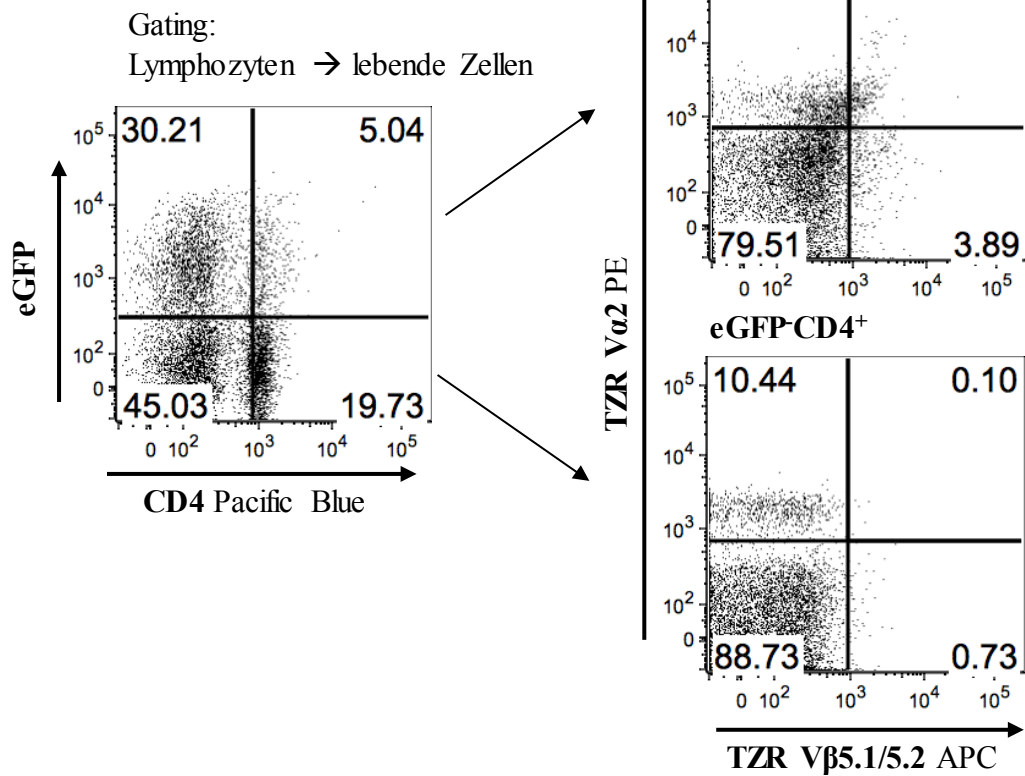


Abb. A9. Plasmidkarte des rekombinanten MD4 BZR im retroviralen Zielvektor pR1330. Ein ausgewählter rekombinanter Klon wurde in mehreren Reaktionen vollständig sequenziert und die erhaltenen Sequenzinformationen anschließend mit der Sequenz des retroviralen Zielvektors *in silico* zusammengefügt (Geneious Pro™ Software, Version 5.3).

(A) OTII retrogene Maus



(B) OTII transgene Maus

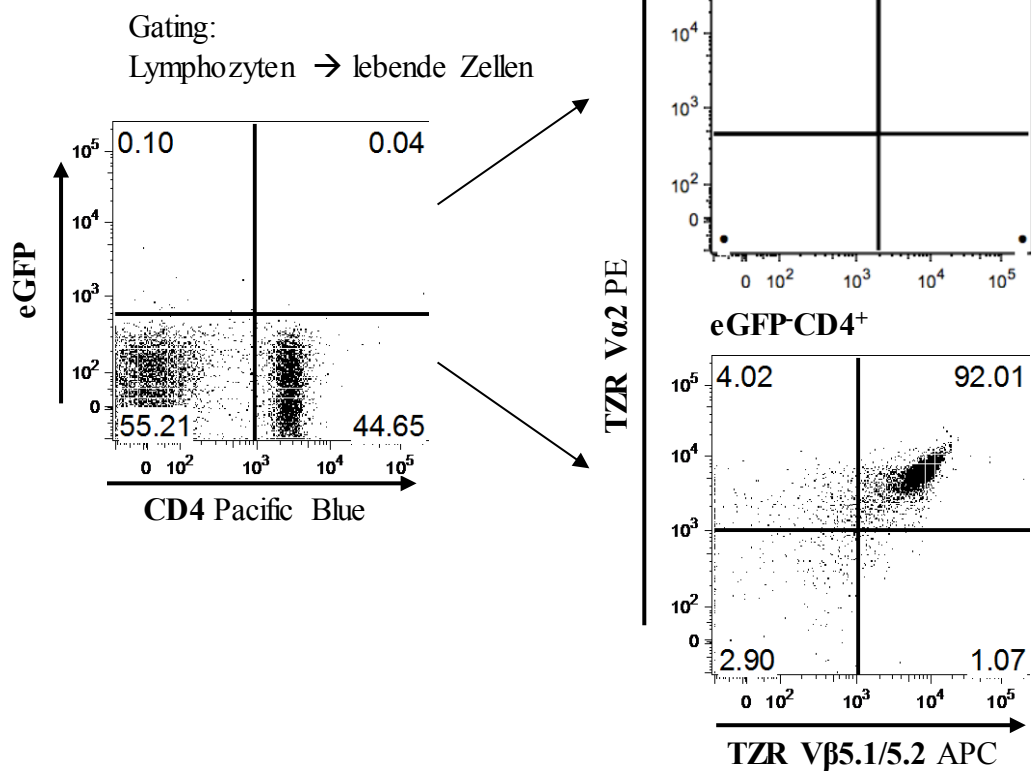


Abb. A10. Generierung OTII TZR retrogener Mäuse (Lymphknoten). Die TZR retrogenen Mäuse wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben generiert und circa 8 Wochen nach Rekonstitution auf die Expression des Retrogens untersucht. Dafür wurden Einzelzellsuspensionen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern spezifisch für CD4 sowie die OTII TZR-Ketten Va2 und Vβ5.1/5.2 inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Lymphknoten (inguinal, axillär) je einer Maus aus beiden Gruppen. In der OTII TZR retrogenen Maus konnte der OTII-spezifische TZR auf ~ 3,4% der eGFP⁺CD4⁺ T-Zellen (**A**), wohingegen er in der OTII transgenen Maus auf ~ 92% der eGFP⁺CD4⁺ T-Zellen detektiert werden konnte (**B**). Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. Tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

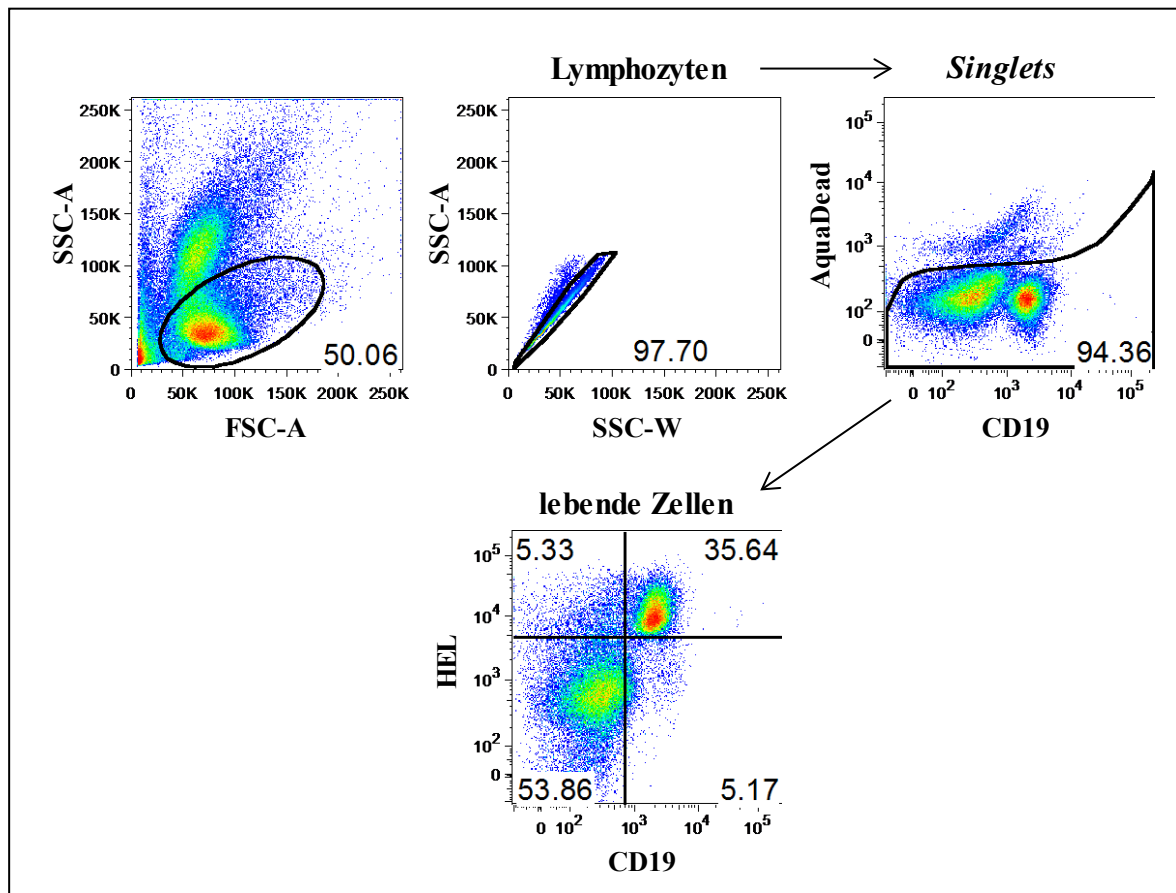
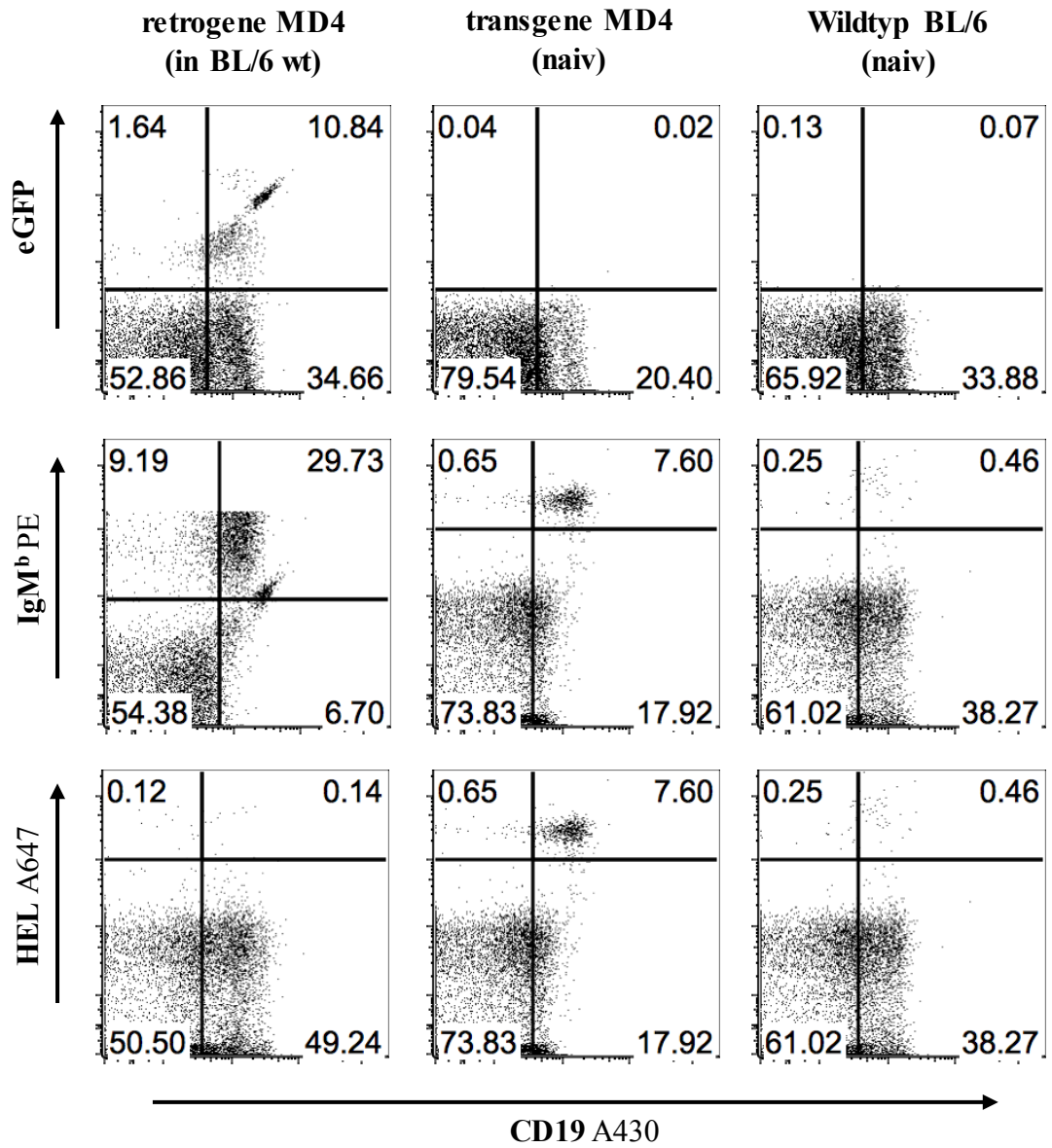
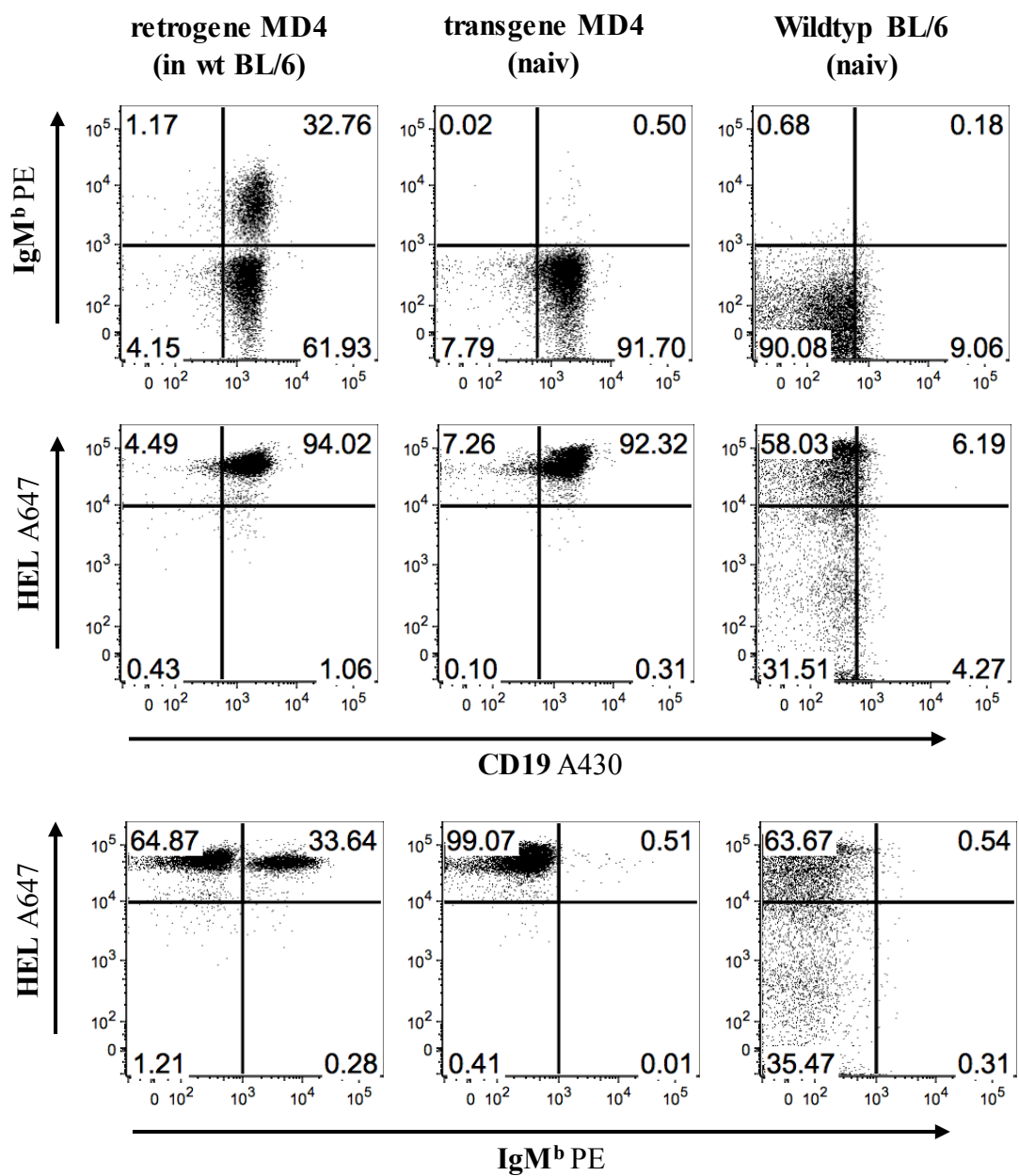


Abb. A11. Gating-Strategie zur Analyse der MD4 retrogenen Mäuse. Durch Eingrenzen der Lymphozytenpopulation wurde die Auswertung auf ausschließlich diese Zellen beschränkt. Im nächsten Schritt erfolgte die Auswahl einzelner Zellen (*Singlets*). Schließlich wurden tote Zellen von der Analyse ausgeschlossen und somit lediglich lebende Zellen für die Analyse der untersuchten Parameter betrachtet.

(A) Lymphknoten

(B) Lymphknoten

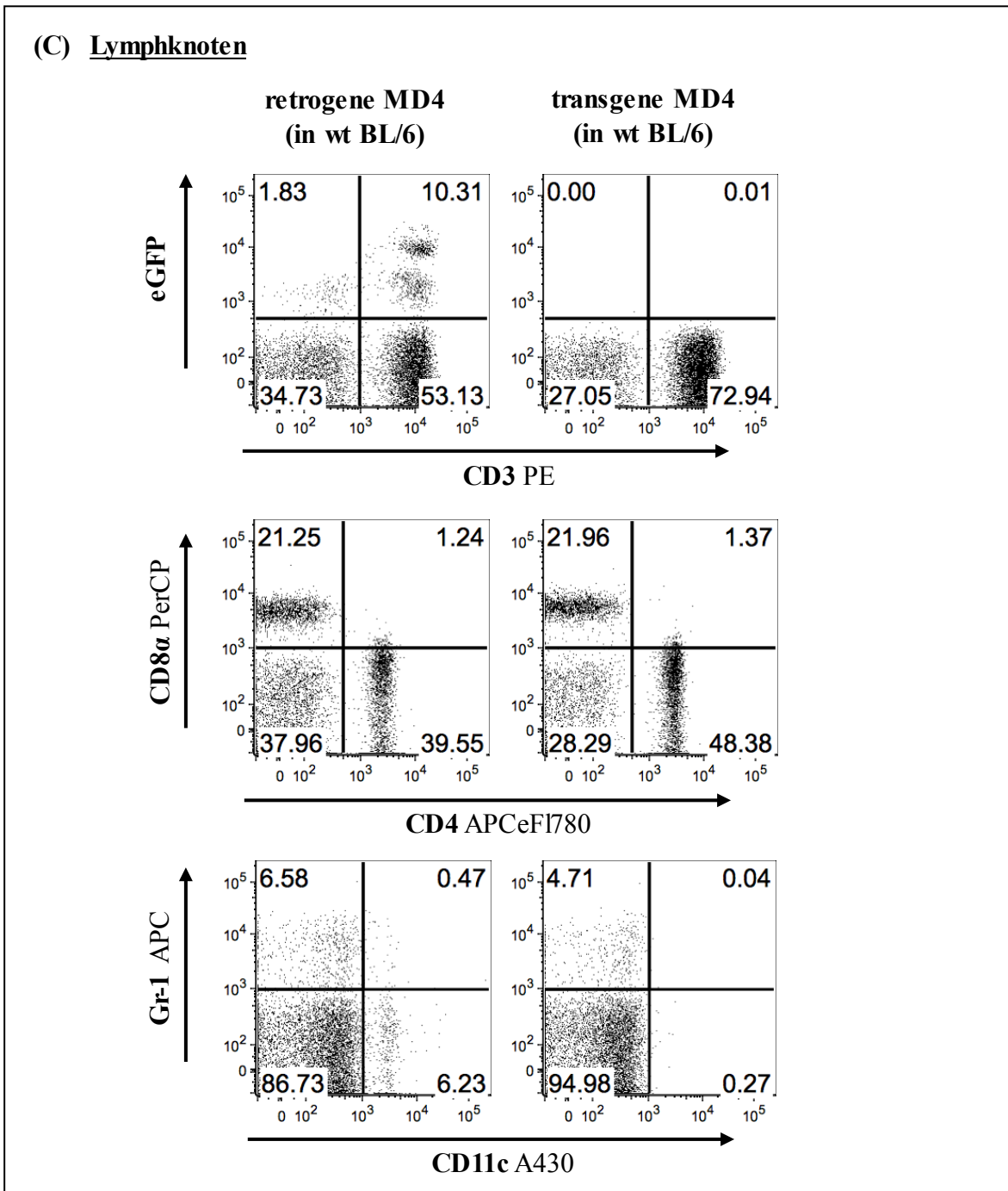
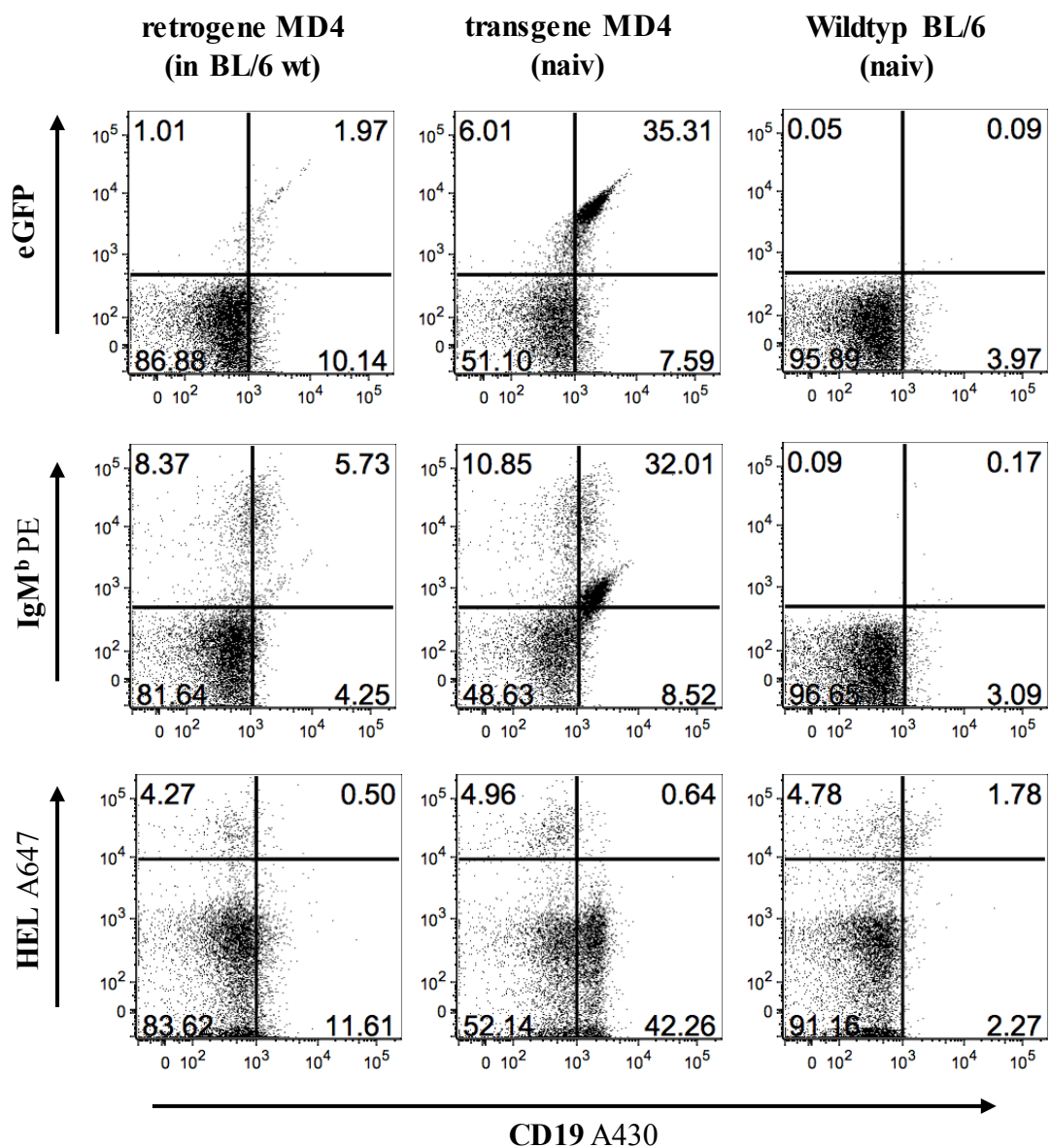


Abb. A12. Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens in den Lymphknoten. BZR retrogene Mäuse wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben generiert; C57BL/6 Wildtypmäuse dienten als Spender und Empfänger des Knochenmarks. Die Analyse erfolgte ~ 8 bis 10 Wochen nach der Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfängertiere. Einzelzellsuspensionen wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrollen dienten MD4 transgene sowie C57BL/6 Wildtypmäuse. Dargestellt sind die Ergebnisse für Lymphknoten. (A) Oberflächenfärbung für CD19, IgM^b und HEL. Transduzierte Zellen sind eGFP⁺. Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. Tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. (B) Intrazelluläre Färbung für dieselben Parameter wie in (A). (C) Oberflächenfärbung für nicht-B-Zell-Marker (CD3, CD4, CD8, CD11c, Gr-1). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

(A) Knochenmark

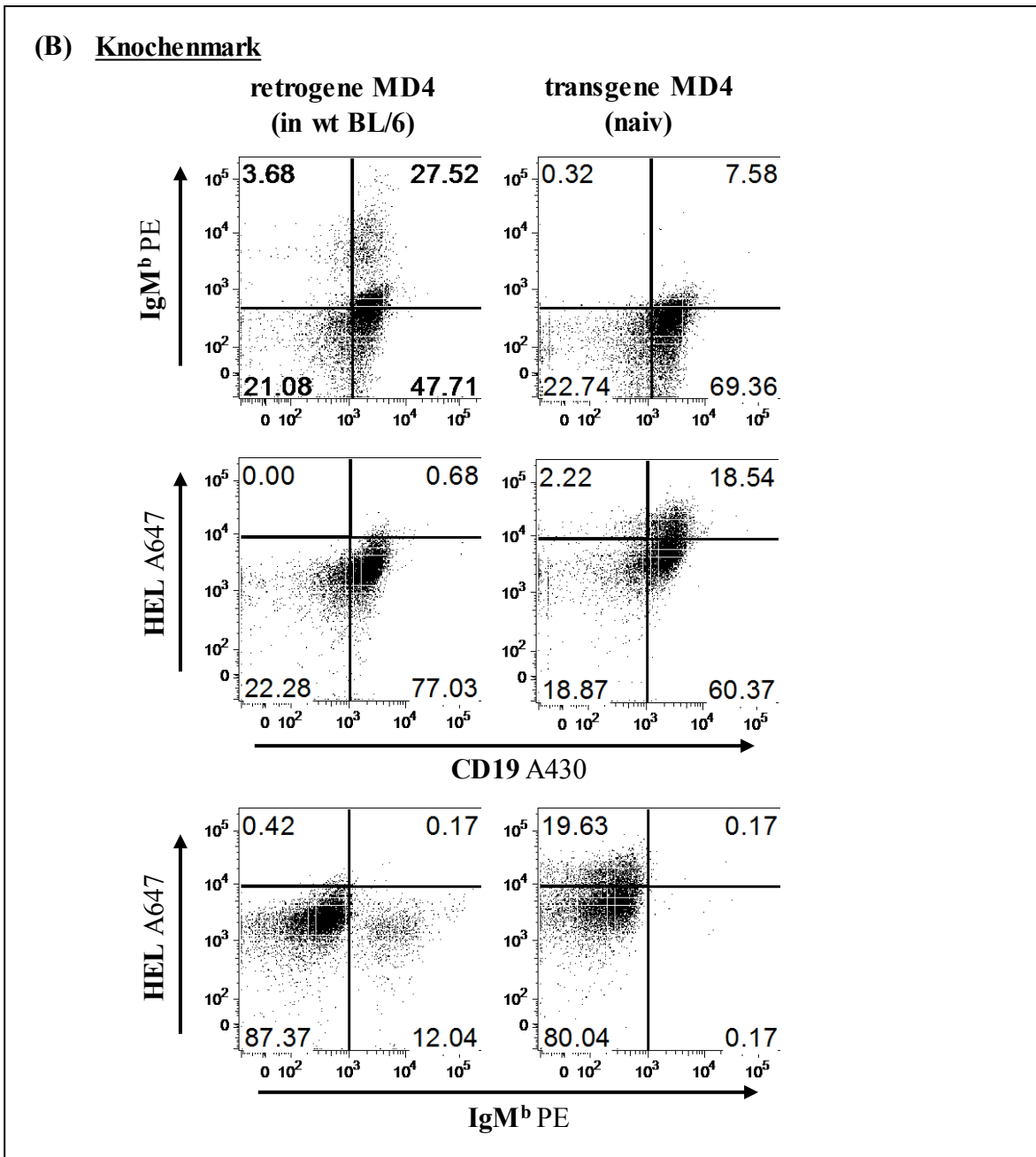
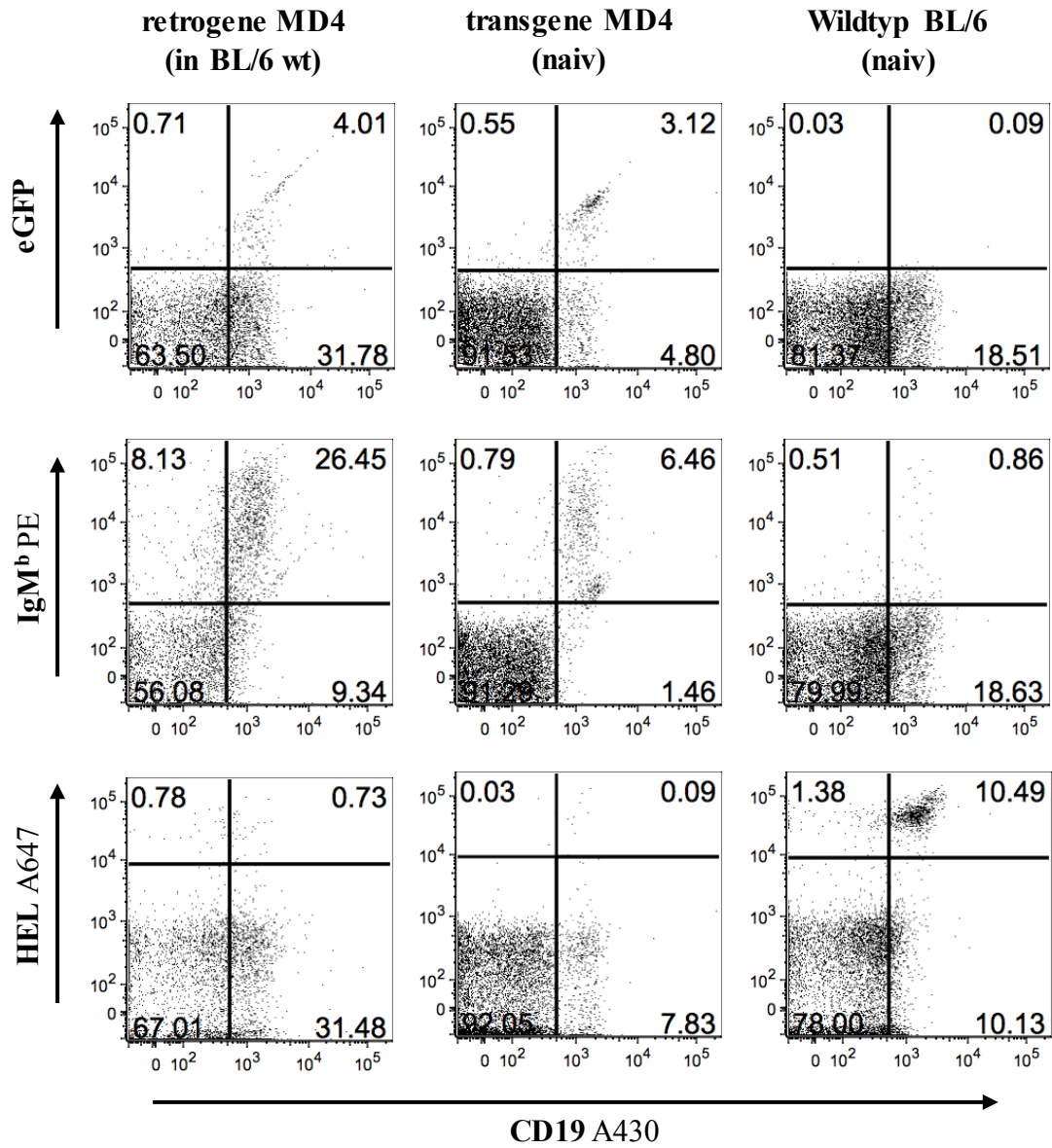


Abb. A13. Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens im Knochenmark. BZR retrogene Mäuse wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben generiert; C57BL/6 Wildtypmäuse dienten als Spender und Empfänger des Knochenmarks. Die Analyse erfolgte ~ 8 bis 10 Wochen nach der Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfängertiere. Einzelzellsuspensionen wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrollen dienten MD4 transgene sowie C57BL/6 Wildtypmäuse. Dargestellt sind die Ergebnisse für das **Knochenmark**. (A) Oberflächenfärbung für CD19, IgM^b und HEL. Transduzierte Zellen sind eGFP⁺. Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. Tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. (B) Intrazelluläre Färbung für dieselben Parameter wie in (A). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

(A) Blut

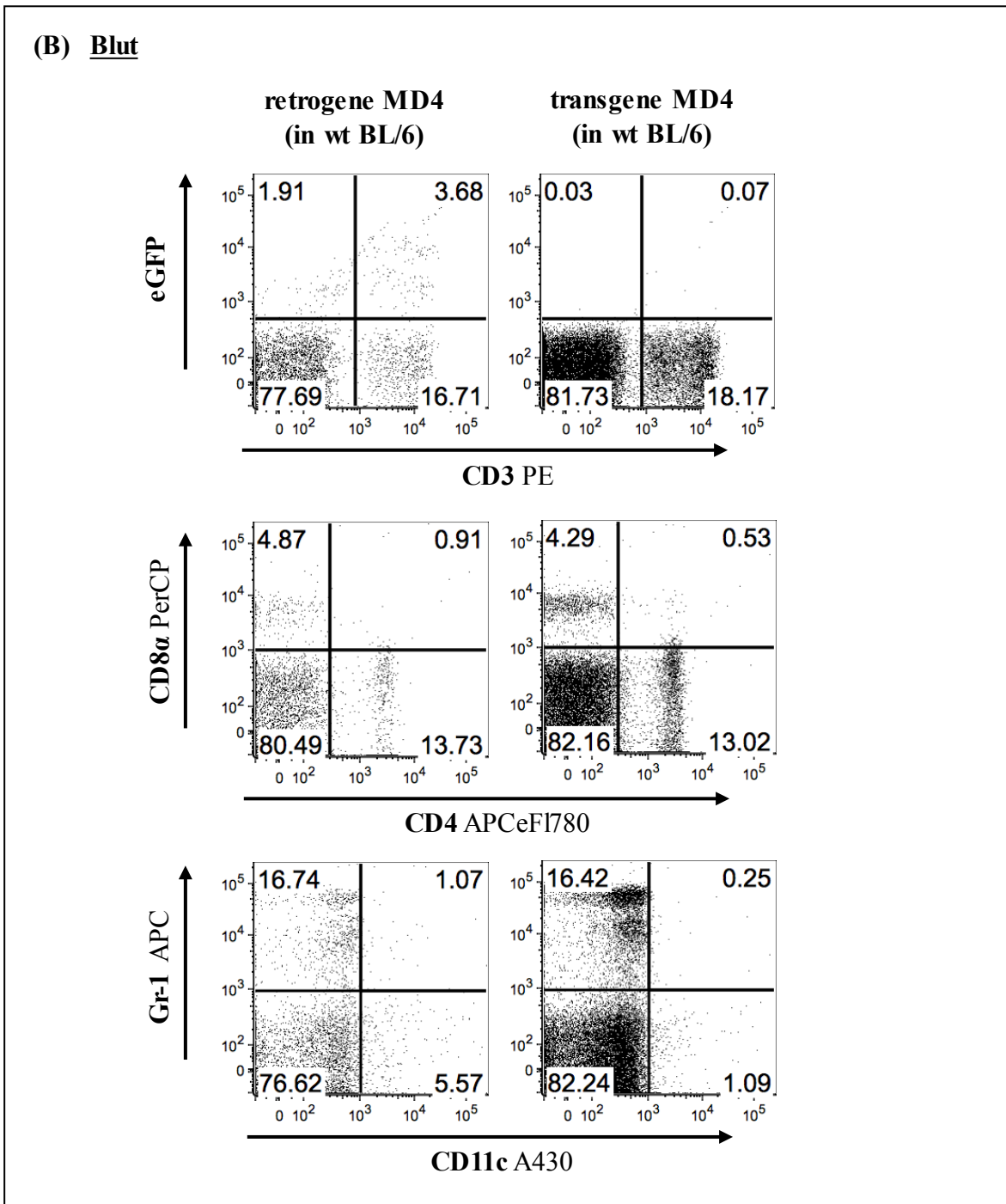
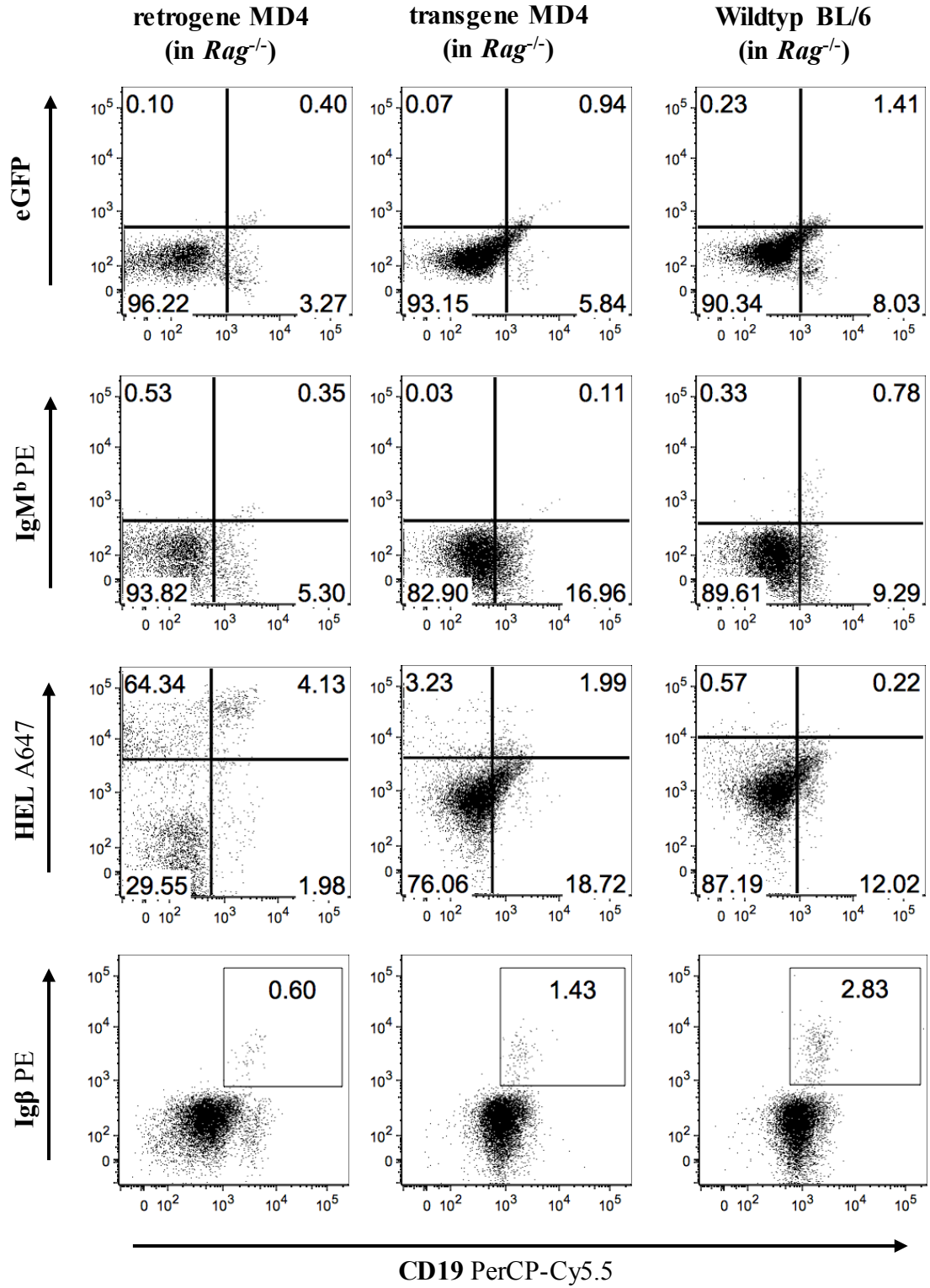


Abb. A14. Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens im Blut. BZR retrogene Mäuse wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben generiert; C57BL/6 Wildtypmäuse dienten als Spender und Empfänger des Knochenmarks. Die Analyse erfolgte ~ 8 bis 10 Wochen nach der Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfängertiere. Einzelzellsuspensionen wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrollen dienten MD4 transgene sowie C57BL/6 Wildtypmäuse. Dargestellt sind die Ergebnisse für Blut. **(A)** Oberflächenfärbung für CD19, IgM^b und HEL. Transduzierte Zellen sind eGFP⁺. Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. Tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. **(B)** Oberflächenfärbung für nicht-B-Zell-Marker (CD3, CD4, CD8, CD11c, Gr-1). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

(A) Knochenmark



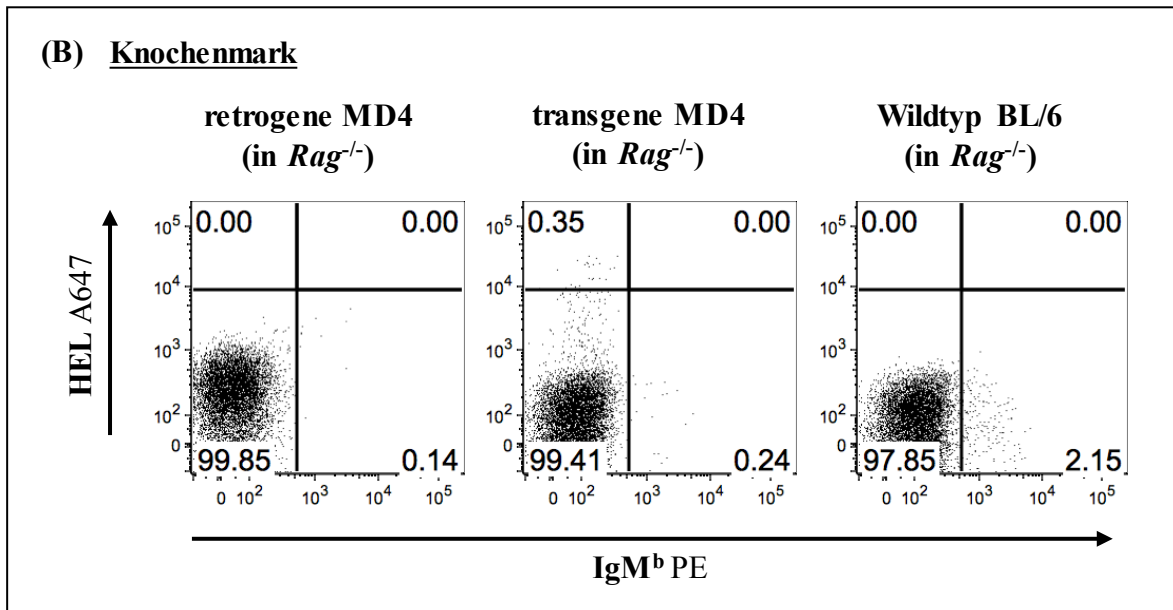
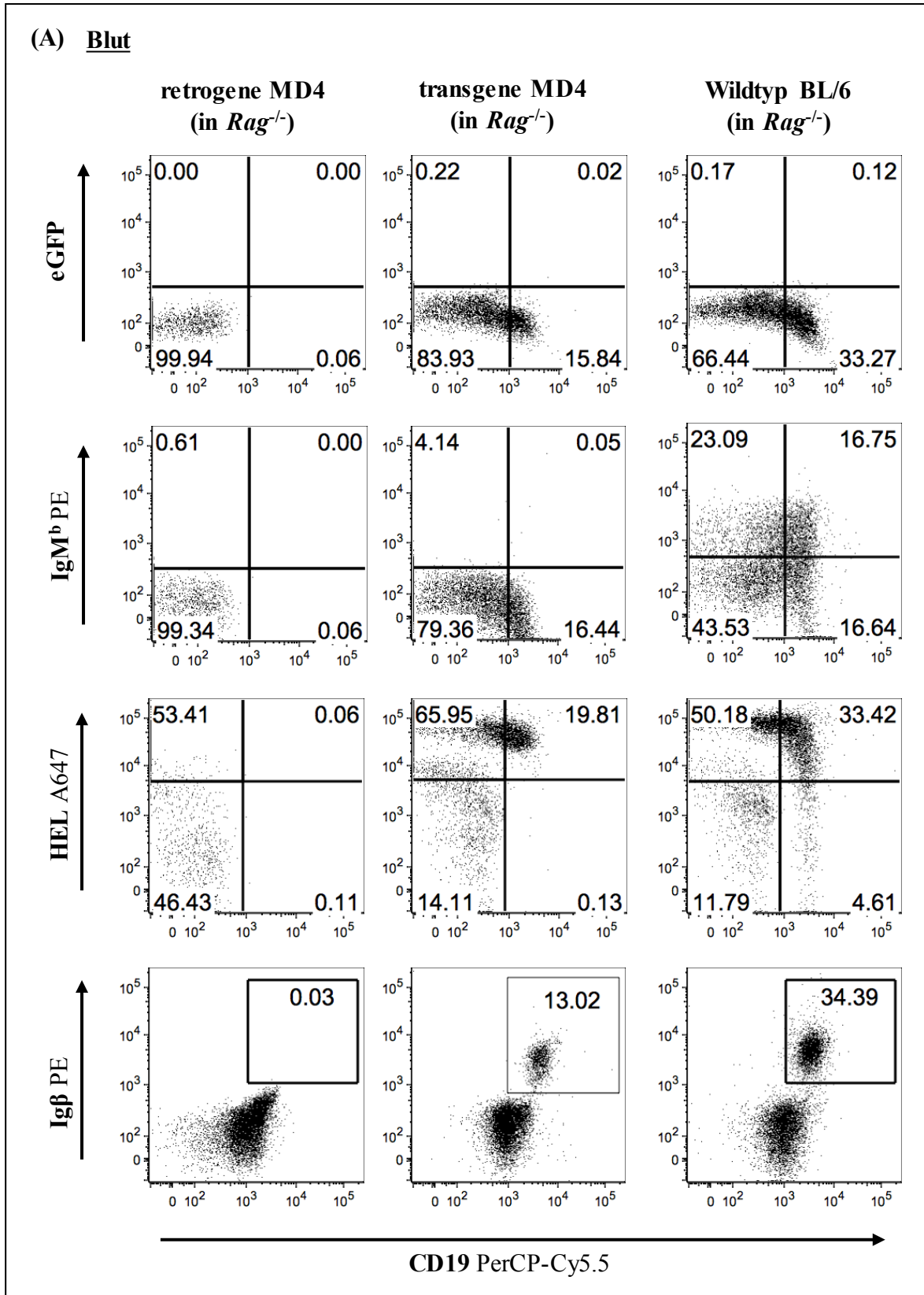
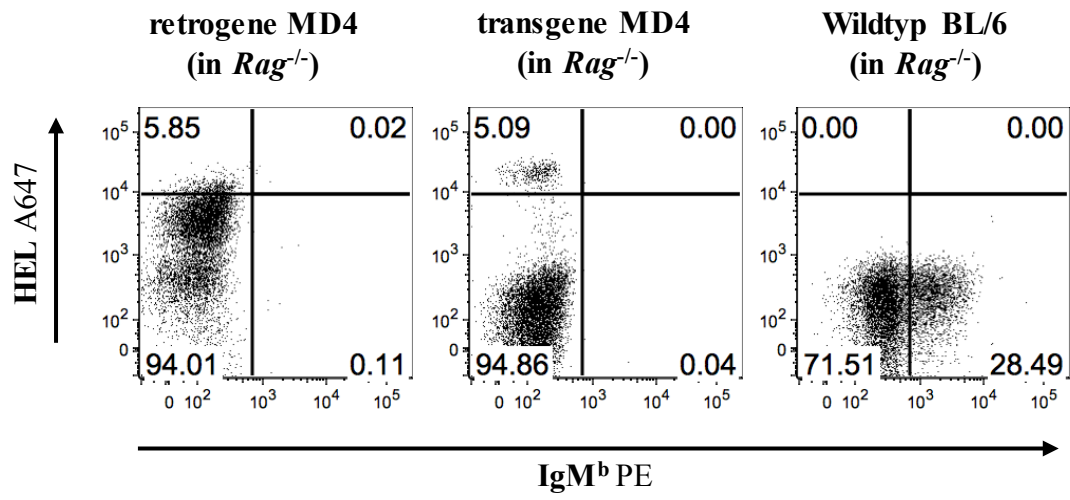


Abb. A15. Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse (*Rag*^{-/-}) zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens im Knochenmark. BZR retrogene Mäuse wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben generiert. Die Analyse erfolgte 8 Wochen nach der Rekonstitution der lethal bestrahlten *Rag*^{-/-} Empfänger. Einzelzellsuspensionen wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrollen dienten mit transgenen MD4- sowie mit C57BL/6 Wildtypknochenmarkszellen rekonstituierte *Rag*^{-/-}. Dargestellt sind die Ergebnisse für das Knochenmark. Tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. **(A)** Oberflächenfärbung für CD19, IgMb, das Antigen HEL und Igβ (CD79b). Transduzierte Zellen sind eGFP⁺. Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. **(B)** Intrazelluläre Färbung für dieselben Parameter wie in (A).



(B) Blut

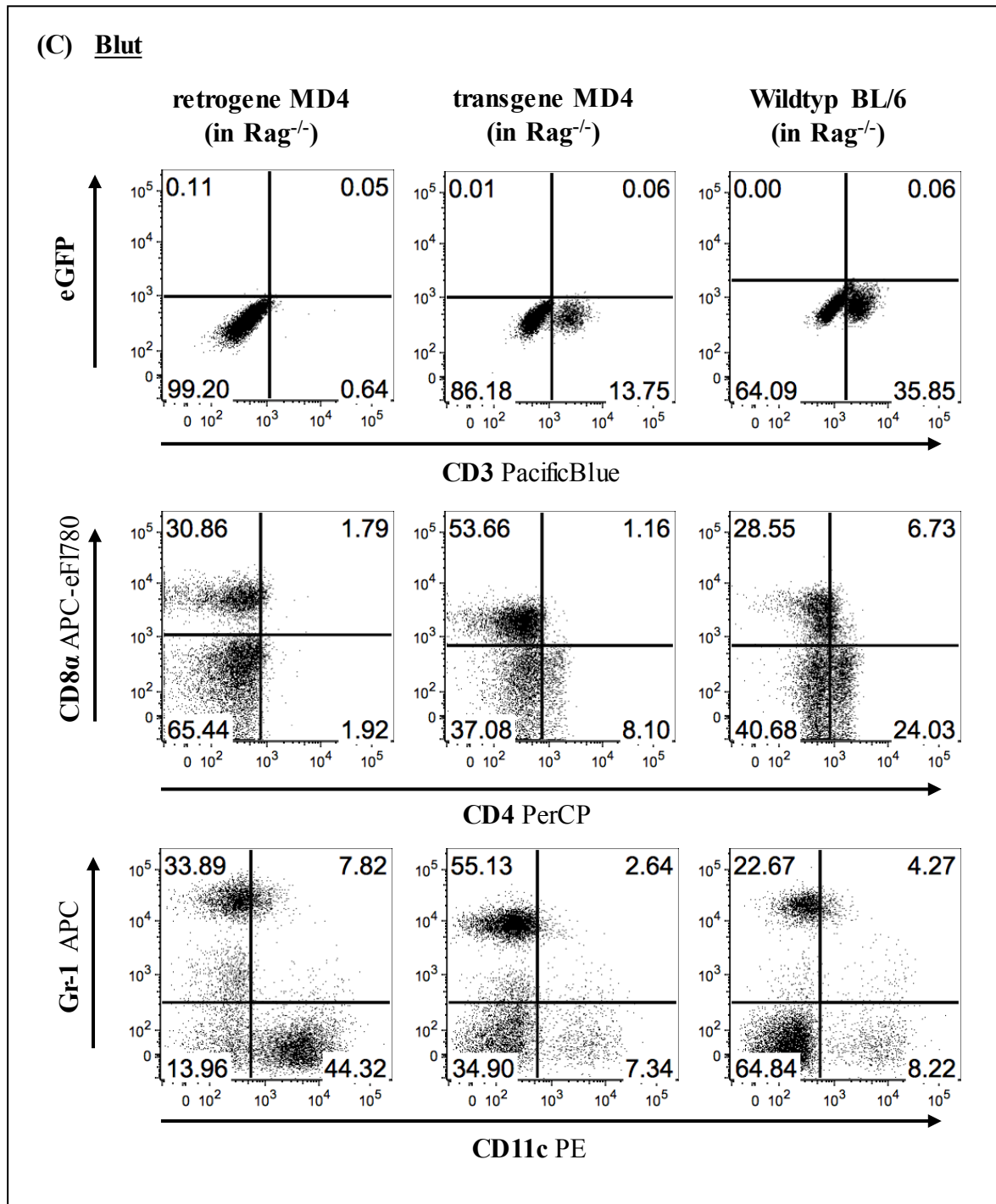


Abb. A16. Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse (*Rag*^{-/-}) zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens im Blut. BZR retrogene Mäuse wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben generiert. Die Analyse erfolgte 8 Wochen nach der Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfängertiere. Einzelzellsuspensionen wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrollen dienten mit transgenem MD4- sowie mit C57BL/6 Wildtypknochenmarkszellen rekonstituierte *Rag*^{-/-}. Dargestellt sind die Ergebnisse für das Blut. **(A)** Oberflächenfärbung für CD19, IgM^b und HEL. Transduzierte Zellen sind eGFP⁺. Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. Tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. **(B)** Intrazelluläre Färbung für dieselben Parameter wie in (A). **(C)** Oberflächenfärbung für nicht-B-Zell-Marker (CD3, CD4, CD8, CD11c, Gr-1). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

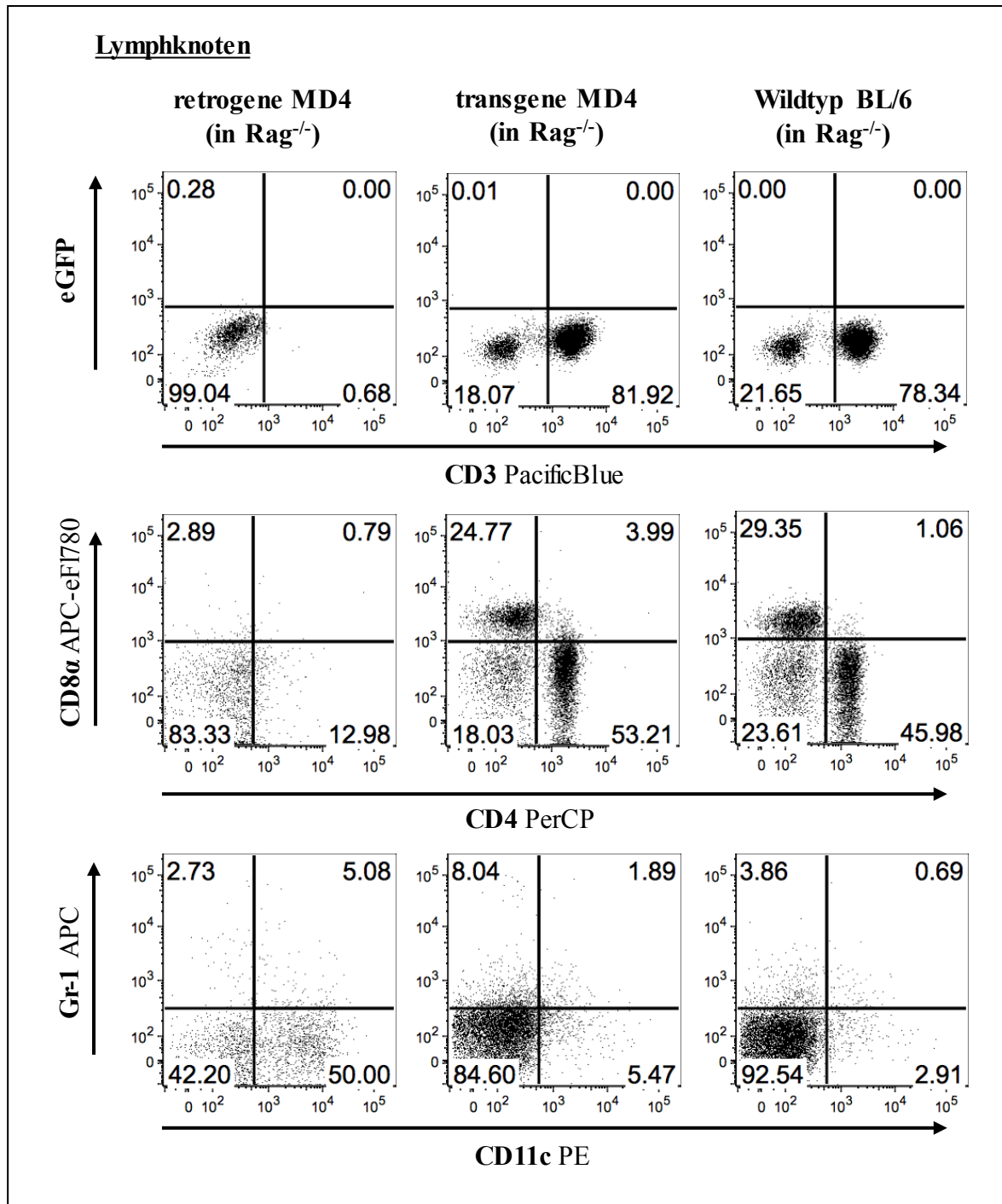


Abb. A17. Die Analyse der MD4 retrogenen Mäuse (*Rag*^{-/-}) zeigt eine sehr schwache Expression des Retrogens in den Lymphknoten. BZR retrogene Mäuse wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben generiert. Die Analyse erfolgte 8 Wochen nach der Rekonstitution der lethal bestrahlten Empfängertiere. Einzelzellsuspensionen wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrollen dienten mit transgenem MD4- sowie mit C57BL/6 Wildtypknochenmarkszellen rekonstituierte *Rag*^{-/-}. Dargestellt sind die Ergebnisse für Lymphknoten. Oberflächenfärbung für nicht-B-Zell-Marker (CD3, CD4, CD8, CD11c, Gr-1). Die Zahlen in den Quadranten geben an wieviel Prozent der Zellen den jeweiligen Marker exprimieren. Tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

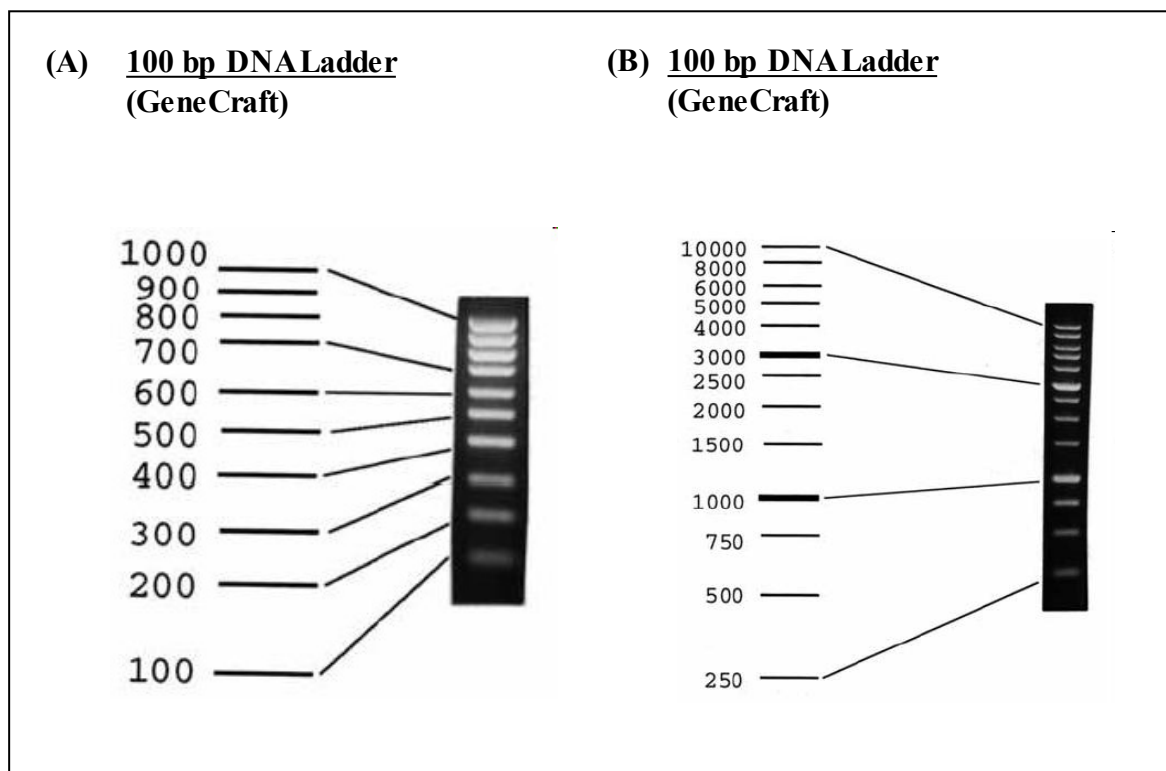


Abb. A18. Verwendete DNA-Größenstandards (GENECRAFT).

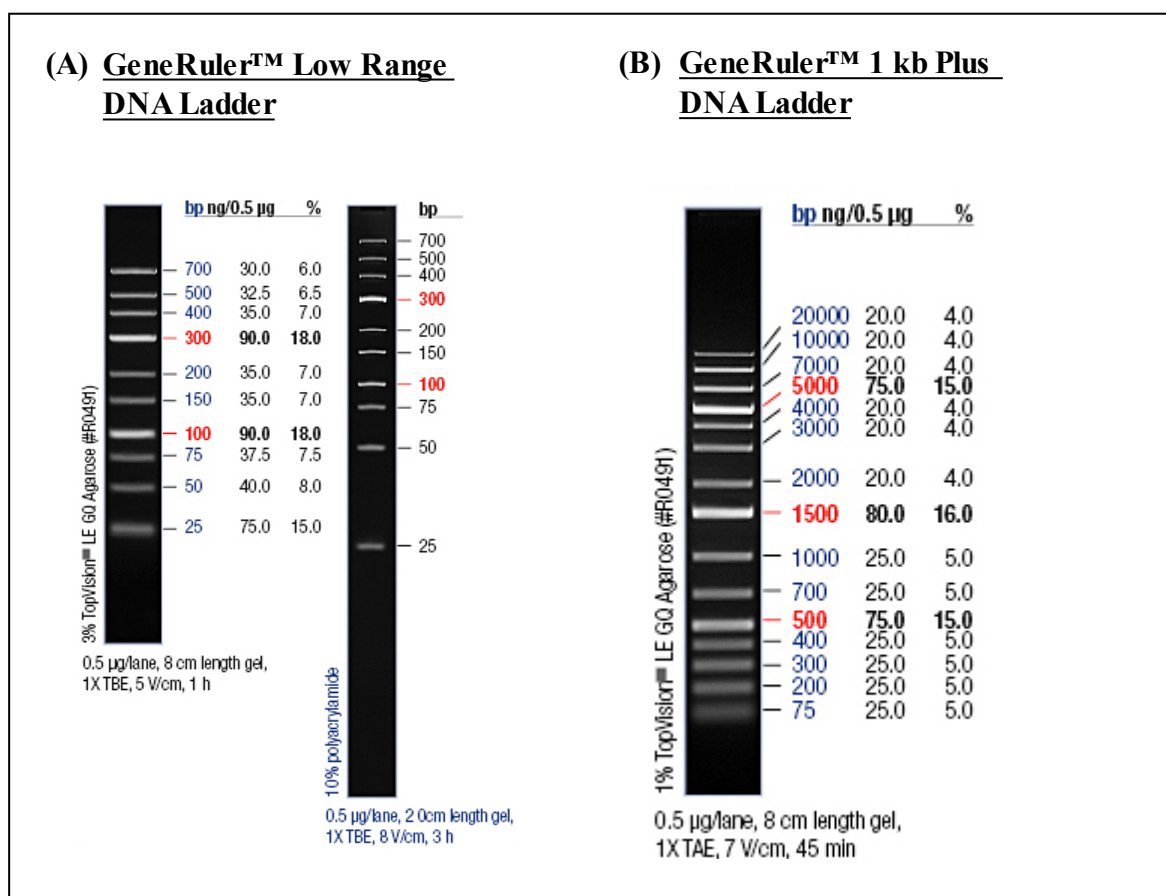


Abb. A19. Verwendete DNA-Größenstandards (GeneRuler™, FERMENTAS/THERMOSCIENTIFIC).

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 – 170 kDa)
(Fermentas/Thermo Scientific)

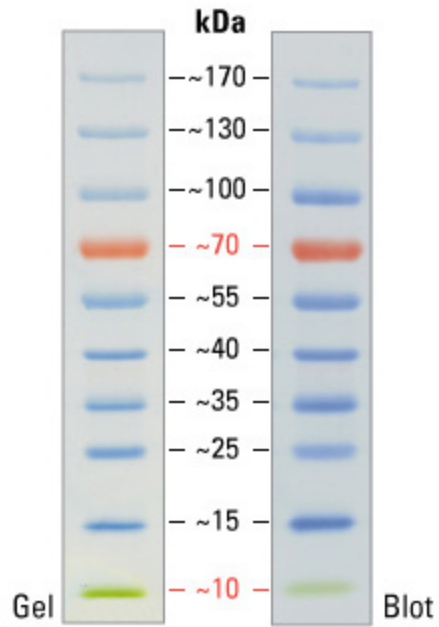


Abb. A20. Verwendeter Protein-Größenstandard.

LITERATURVERZEICHNIS

- Alli, R., P. Nguyen and T. L. Geiger (2008). "Retrogenic modeling of experimental allergic encephalomyelitis associates T cell frequency but not TCR functional affinity with pathogenicity." J Immunol **181**(1): 136-145.
- Asquith, D., A. Miller, I. McInnes and F. Liew (2009). "Animal models of rheumatoid arthritis." Eur J Immunol. **39**(8): 2040-2044.
- Barnden, M., J. Allison, W. Heath and F. Carbone (1998). "Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements." Immunol Cell Biol. **76**(1): 34-40.
- Bell, S. and C. Goodnow (1994). "A selective defect in IgM antigen receptor synthesis and transport causes loss of cell surface IgM expression on tolerant B lymphocytes." EMBO J. **13**(4): 816-826.
- Bettini, M., M. Bettini and D. Vignali (2012). "T-cell receptor retrogenic mice: a rapid, flexible alternative to T-cell receptor transgenic mice." Immunology **136**(3): 265-272.
- Blattner, F. and P. Tucker (1984). "The molecular biology of immunoglobulin D." Nature. **307**(5950): 417-422.
- Bockermann, R., D. Schubert, T. Kamradt and R. Holmdahl (2005). "Induction of a B-cell-dependent chronic arthritis with glucose-6-phosphate isomerase." Arthritis Res Ther. **7**(6): R1316-1324.
- Boyd, A. W. and J. W. Schrader (1981). "The regulation of growth and differentiation of a murine B cell lymphoma. II. The inhibition of WEHI 231 by anti-immunoglobulin antibodies." J Immunol. **126**(6): 2466-2469.
- Brady, B., N. Steinle and C. Bassing (2010). "Antigen receptor allelic exclusion: an update and reappraisal." J Immunol. **185**(7): 3801-3808.
- Cao, X., X. Wu, D. Frassica, B. Yu, L. Pang, L. Xian, M. Wan, W. Lei, M. Armour, E. Tryggestad, J. Wong, C. Wen, W. Lu and F. Frassica (2010). "Irradiation induces bone injury by damaging bone marrow microenvironment for stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A. **108**(4): 1609-1614.

- Chang, A. and M. Sadelain (2007). "The genetic engineering of hematopoietic stem cells: the rise of lentiviral vectors, the conundrum of the ltr, and the promise of lineage-restricted vectors." Mol Ther. **15**(3): 445-456.
- Cherry, S., D. Binischkiewicz, L. van Parijs, D. Baltimore and R. Jaenisch (2000). "Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells." Mol Cell Biol. **20**(20): 7419-7426.
- Clark, M., A. Cooper, L. Wang and I. Aifantis (2005). "The pre-B cell receptor in B cell development: recent advances, persistent questions and conserved mechanisms." Curr Top Microbiol Immunol. **290**: 87-103.
- Clark, M., M. Mandal, K. Ochiai and H. Singh (2014). "Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling." Nat Rev Immunol. **14**(2): 69-80.
- Corfe, S. and C. Paige (2012). "The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation." Semin Immunol. **24**(3): 198-208.
- Corfe, S. A., A. P. Gray and C. J. Paige (2007). "Generation and characterization of stromal cell independent IL-7 dependent B cell lines." J Immunol Methods **325**(1-2): 9-19.
- de Felipe, P. (2004). "Skipping the co-expression problem: the new 2A "CHYSEL" technology." Genet Vaccines Ther **2**(1): 13.
- de Felipe, P., L. E. Hughes, M. D. Ryan and J. D. Brown (2003). "Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide." J Biol Chem **278**(13): 11441-11448.
- de Felipe, P., G. Luke, L. Hughes, D. Gani, C. Halpin and M. D. Ryan (2006). "E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein." Trends in Biotechnology **24**(2): 68-75.
- de Felipe, P., V. Martín, M. Cortés, M. Ryan and M. Izquierdo (1999). "Use of the 2A sequence from foot-and-mouth disease virus in the generation of retroviral vectors for gene therapy." Gene Ther. **6**(2): 198-208.
- Dias, S., H. J. Silva, A. Cumano and P. Vieira (2005). "Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors." J Exp Med. **201**(6): 971-979.

- Donnelly, M. L., D. Gani, M. Flint, S. Monaghan and M. D. Ryan (1997). "The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins." J Gen Virol **78** (Pt 1): 13-21.
- Donnelly, M. L., L. E. Hughes, G. Luke, H. Mendoza, E. ten Dam, D. Gani and M. D. Ryan (2001). "The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences." J Gen Virol **82**(Pt 5): 1027-1041.
- Donnelly, M. L., G. Luke, A. Mehrotra, X. Li, L. E. Hughes, D. Gani and M. D. Ryan (2001). "Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'." J Gen Virol **82**(Pt 5): 1013-1025.
- Dylke, J., J. Lopes, M. Dang-Lawson, S. Machtaler and L. Matsuuchi (2007). "Role of the extracellular and transmembrane domain of Ig-alpha/beta in assembly of the B cell antigen receptor (BCR)." Immunol Lett. **112**(1): 47-57.
- Fang, J., J. Qian, S. Yi, T. Harding, G. Tu, M. VanRoey and K. Jooss (2005). "Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide." Nat Biotechnol. **23**(5): 584-590.
- Fang, J., S. Yi, A. Simmons, G. Tu, M. Nguyen, T. Harding, M. VanRoey and K. Jooss (2007). "An antibody delivery system for regulated expression of therapeutic levels of monoclonal antibodies in vivo." Mol Ther. **15**(6): 1153-1159.
- Frey, O., L. Bruns, L. Morawietz, K. Dunussi-Joannopoulos and T. Kamradt (2011). "B cell depletion reduces the number of autoreactive T helper cells and prevents glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis." PLoS One **6**(9): e24718.
- Goodnow, C. C., R. Brink and E. Adams (1991). "Breakdown of self-tolerance in anergic B lymphocytes." Nature **352**(6335): 532-536.
- Goodnow, C. C., J. Crosbie, S. Adelstein, T. B. Lavoie, S. J. Smith-Gill, R. A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, J. S. Wotherspoon, R. H. Loblay, K. Raphael and et al. (1988). "Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice." Nature **334**(6184): 676-682.
- Goodnow, C. C., J. Crosbie, H. Jorgensen, R. A. Brink and A. Basten (1989). "Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes." Nature **342**(6248): 385-391.
- Greenberger, J. and M. Epperly (2009). "Bone marrow-derived stem cells and radiation response." Semin Radiat Oncol. **19**(2): 133-139.

- Haan, C., H. Hermanns, P. Heinrich and I. Behrmann (2000). "A single amino acid substitution (Trp(666)-->Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction." Biochem J. **349**(Pt 1): 261-266.
- Halpin, C., S. Cooke, A. Barakate, A. El Amrani and M. Ryan (1999). "Self-processing 2A-polypeptides--a system for co-ordinate expression of multiple proteins in transgenic plants." Plant J. **17**(4): 453-459.
- Hardy, R., Y. Li, D. Allman, M. Asano, M. Gui and K. Hayakawa (2000). "B-cell commitment, development and selection." Immunol Rev. **175**: 23-32.
- Hardy, R. R. (1990). "Development of murine B cell subpopulations." Semin Immunol **2**(3): 197-206.
- Hardy, R. R. (1991). "CD5 B cells: a separate lineage at last?" Curr Biol **1**(5): 290-292.
- Hartley, S. and C. Goodnow (1994). "Censoring of self-reactive B cells with a range of receptor affinities in transgenic mice expressing heavy chains for a lysozyme-specific antibody. ." Int Immunol. **6**(9): 1417-1425.
- Hartley, S. B., J. Crosbie, R. Brink, A. B. Kantor, A. Basten and C. C. Goodnow (1991). "Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens." Nature **353**(6346): 765-769.
- Herzog, S., M. Reth and H. Jumaa (2009). "Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling." Nat Rev Immunol. **9**(3): 195-205.
- Holst, J., A. L. Szymczak-Workman, K. M. Vignali, A. R. Burton, C. J. Workman and D. A. Vignali (2006). "Generation of T-cell receptor retrogenic mice." Nat Protoc **1**(1): 406-417.
- Holst, J., K. M. Vignali, A. R. Burton and D. A. Vignali (2006). "Rapid analysis of T-cell selection in vivo using T cell-receptor retrogenic mice." Nat Methods **3**(3): 191-197.
- Hombach, J., T. Tsubata, L. Leclercq, H. Stappert and M. Reth (1990). "Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class." Nature **343**(6260): 760-762.
- Jaenisch, R. (1975). "Infection of mouse blastocysts with SV40 DNA: normal development of the infected embryos and persistence of SV40-specific DNA sequences in the adult animals." Cold Spring Harb Symp Quant Biol. **39**: 375-380.

- Jaenisch, R. (1976). "Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus." Proc Natl Acad Sci U S A. **73**(4): 1260-1264.
- Jaenisch, R. and B. Mintz (1974). "Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA." Proc Natl Acad Sci U S A. **71**(4): 1250-1254.
- Jainchill, J., S. Aaronson and G. Todaro (1969). "Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells." J Virol. **4**(5): 549-553.
- Ji, H., K. Ohmura, U. Mahmood, D. Lee, F. Hofhuis, S. Boackle, K. Takahashi, V. Holers, M. Walport, C. Gerard, A. Ezekowitz, M. Carroll, M. Brenner, R. Weissleder, J. Verbeek, V. Duchatelle, C. Degott, C. Benoist and D. Mathis (2002). "Arthritis critically dependent on innate immune system players." Immunity. **16**(2): 157-168.
- Kamradt, T. and D. Schubert (2005). "The role and clinical implications of G6PI in experimental models of rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther. **7**(1): 20-28.
- Kang, J. and M. Coles (2012). "IL-7: the global builder of the innate lymphoid network and beyond, one niche at a time." Semin Immunol. **24**(3): 190-197.
- Kayser, F., K. Bienz, J. Eckert and R. Zinkernagel (2005). Medizinische Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag.
- King, K. and M. Goodell (2011). "Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response." Nat Rev Immunol. **11**(10): 685-692.
- Kitamura, D., J. Roes, R. Kuhn and K. Rajewsky (1991). "A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene." Nature **350**(6317): 423-426.
- Korganow, A., H. Ji, S. Mangialaio, V. Duchatelle, R. Pelanda, T. Martin, C. Degott, H. Kikutani, K. Rajewsky, J. Pasquali, C. Benoist and D. Mathis (1999). "From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins." Immunity **10**(4): 451-461.
- Kouskoff, V., A. Korganow, V. Duchatelle, C. Degott, C. Benoist and D. Mathis (1996). "Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity." Cell. **87**(5): 811-822.
- Kurosaki, T., H. Shinohara and Y. Baba (2010). "B cell signaling and fate decision." Annu Rev Immunol. **28**: 21-55.

- Laemmli, U. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature. **227**(5259): 680-685.
- Lanig, H., H. Bradl and H. Jäck (2004). "Three-dimensional modeling of a pre-B-cell receptor." Mol Immunol. **40**(17): 1263-1272.
- Lin, J., T. Chen, K. Weng, S. Chang, L. Chen and S. Shih (2009). "Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle." J Biomed Sci. **16**(103).
- Lois, C., Y. Refaeli, X. Qin and L. Van Parijs (2001). "Retroviruses as tools to study the immune system." Curr Opin Immunol. **13**(4): 496-504.
- Lund, F. and T. Randall (2010). "Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity." Nat Rev Immunol. **10**(4): 236-247.
- Luning Prak, E. T., M. Monestier and R. A. Eisenberg (2011). "B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity." Ann N Y Acad Sci. **1217**: 96-121.
- Mason, D. Y., M. Jones and C. C. Goodnow (1992). "Development and follicular localization of tolerant B lymphocytes in lysozyme/anti-lysozyme IgM/IgD transgenic mice." Int Immunol **4**(2): 163-175.
- Mauch, P., L. Constone, J. Greenberger, W. Knospe, J. Sullivan, J. Liesveld and H. Deeg (1995). "Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys. **31**(5): 1319-1339.
- McInnes, I. and G. Schett (2011). "The pathogenesis of rheumatoid arthritis." N Engl J Med. **365**(23): 2205-2219.
- Miller, A. (1990). "Retrovirus packaging cells." Hum Gene Ther. **1**(1): 5-14.
- Milne, C. D., S. A. Corfe and C. J. Paige (2008). "Heparan sulfate and heparin enhance ERK phosphorylation and mediate preBCR-dependent events during B lymphopoiesis." J Immunol. **180**(5): 2839-2847.
- Mizuguchi, H., Z. Xu, A. Ishii-Watabe, E. Uchida and T. Hayakawa (2000). "IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector." Mol Ther. **1**(4): 376-382.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, R. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa and V. Papaioannou (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." Cell. **68**(5): 869-877.

- Mülhardt, C. (2006). "Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics." Spektrum Akademischer Verlag **5**.
- Nagasawa, T. (2006). "Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development." Nat Rev Immunol **6**(2): 107-116.
- Nakagawa, R., S. Mason and A. Michie (2006). "Determining the role of specific signaling molecules during lymphocyte development *in vivo*: instant transgenesis." Nature Protocols **1**(3): 1185 - 1193.
- Nakayama, K. (1997). "Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins." Biochem J **327** (Pt 3): 625-635.
- Neefjes, J., M. Jongsmä, P. Paul and O. Bakke (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." Nat Rev Immunol **11**(12): 823-836.
- Padlan, E., E. Silvertown, S. Sheriff, G. Cohen, S. Smith-Gill and D. Davies (1989). "Structure of an antibody-antigen complex: crystal structure of the HyHEL-10 Fab-lysozyme complex." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(15): 5938-5942.
- Parkhouse, R., G. Preece, R. Sutton, J. Cordell and D. Mason (1992). "Relative expression of surface IgM, IgD and the Ig-associating alpha(mb-1) and beta(B-29) polypeptide chains." Immunology **76**(4): 535-540.
- Pieper, K., B. Grimbacher and H. Eibel (2013). "B-cell biology and development." J Allergy Clin Immunol **131**(4): 959-971.
- Pizzolla, A., K. Wing and R. Holmdahl (2013). "A glucose-6-phosphate isomerase peptide induces T and B cell-dependent chronic arthritis in C57BL/10 mice: arthritis without reactive oxygen species and complement." Am J Pathol **183**(4): 1144-1155.
- Puck, T., S. Cieciura and A. Robinson (1958). "Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects." J Exp Med **108**(6): 945-956.
- Ratcliffe, M. (2006). "Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development." Dev Comp Immunol **30**(1-2): 101-118.
- Reichman-Fried, M., M. Bosma and R. Hardy (1993). "B-lineage cells in mu-transgenic scid mice proliferate in response to IL-7 but fail to show evidence of immunoglobulin light chain gene rearrangement." Int Immunol **5**(3): 303-310.

- Roebroek, A. J., J. W. Creemers, T. A. Ayoubi and W. J. Van de Ven (1994). "Furin-mediated proprotein processing activity: involvement of negatively charged amino acid residues in the substrate binding region." Biochimie **76**(3-4): 210-216.
- Ryan, M. D. and J. Drew (1994). "Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein." EMBO J **13**(4): 928-933.
- Ryan, M. D., A. M. King and G. P. Thomas (1991). "Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence." J Gen Virol **72 (Pt 11)**: 2727-2732.
- Schubert, D., B. Maier, L. Morawietz, V. Krenn and T. Kamradt (2004). "Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice." J Immunol **172**(7): 4503-4509.
- Schuster, I., D. Busch, E. Eppinger, E. Kremmer, S. Milosevic, C. Hennard, C. Kuttler, J. Ellwart, B. Frankenberger, E. Nössner, C. Salat, C. Bogner, A. Borkhardt, H. Kolb and A. Krackhardt (2007). "Allorestricted T cells with specificity for the FMNL1-derived peptide PP2 have potent antitumor activity against hematologic and other malignancies." Blood. **110**(8): 2931-2939.
- Schwartz, G., R. Neta, R. Vigneulle, M. Patchen and T. MacVittie (1988). "Recovery of hematopoietic colony-forming cells in irradiated mice pretreated with interleukin 1 (IL-1)." Exp Hematol. **16**(9): 752-757.
- Scott, D., F. Wolfe and T. Huizinga (2010). "Rheumatoid arthritis." Lancet. **376**(9746): 1094-1108.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, K. Lam, E. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young and A. e. a. Stall (1991). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." Cell. **68**(5): 855-867.
- Silverton, E., E. Padlan, D. Davies, S. Smith-Gill and M. Potter (1984). "Crystalline monoclonal antibody Fabs complexed to hen egg white lysozyme." J Mol Biol. **180**(3): 761-765.
- Smith-Gill, S. J., T. B. Lavoie and C. R. Mainhart (1984). "Antigenic regions defined by monoclonal antibodies correspond to structural domains of avian lysozyme." J Immunol **133**(1): 384-393.

- Smith-Gill, S. J., C. R. Mainhart, T. B. Lavoie, S. Rudikoff and M. Potter (1984). "VL-VH expression by monoclonal antibodies recognizing avian lysozyme." J Immunol **132**(2): 963-967.
- Smith-Gill, S. J., A. C. Wilson, M. Potter, E. M. Prager, R. J. Feldmann and C. R. Mainhart (1982). "Mapping the antigenic epitope for a monoclonal antibody against lysozyme." J Immunol **128**(1): 314-322.
- Stanway, G. (1990). "Structure, function and evolution of picornaviruses." J Gen Virol. **71**(11): 2483-2501.
- Swift, S., J. Lorens, P. Achacoso and G. Nolan (2001). "Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems." Curr Protoc Immunol.: Chapter 10:Unit 10.17C.
- Szymczak, A. L., C. J. Workman, Y. Wang, K. M. Vignali, S. Dilioglou, E. F. Vanin and D. A. Vignali (2004). "Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector." Nat Biotechnol **22**(5): 589-594.
- Thomas, G. (2002). "Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease." Nat Rev Mol Cell Biol. **3**(10): 753-766.
- Vale, A. and H. J. Schroeder (2010). "Clinical consequences of defects in B-cell development." J Allergy Clin Immunol. **125**(4): 778-787.
- van de Ven, W. J., J. Voorberg, R. Fontijn, H. Pannekoek, A. M. van den Ouweland, H. L. van Duijnhoven, A. J. Roebroek and R. J. Siezen (1990). "Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes." Mol Biol Rep **14**(4): 265-275.
- Vettermann, C., K. Herrmann, C. Albert, E. Roth, M. Bösl and H. Jäck (2008). "A unique role for the lambda5 nonimmunoglobulin tail in early B lymphocyte development." J Immunol. **181**(5): 3232-3242.
- Vettermann, C. and H. Jäck (2010). "The pre-B cell receptor: turning autoreactivity into self-defense." Trends Immunol. **31**(5): 176-183.
- Vettermann, C. and M. Schlissel (2010). "Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms." Immunol Rev. **237**(1): 22-42.
- Vieira, P. and A. Cumano (2004). "Differentiation of B lymphocytes from hematopoietic stem cells." Methods Mol Biol. **271**: 67-76.

- Wang, Y., L. Liu, S. Pazhanisamy, H. Li, A. Meng and D. Zhou (2010). "Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells." Free Radic Biol Med. **48**(2): 348-356.
- Wilson, A. and A. Trumpp (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." Nat Rev Immunol. **6**(2): 93-106.
- Yan, J., H. Wang, Q. Xu, N. Jain, V. Toxavidis, J. Tigges, H. Yang, G. Yue and W. Gao (2010). "Signal sequence is still required in genes downstream of "autocleaving" 2A peptide for secretory or membrane-anchored expression." Anal Biochem. **399**(1): 144-146.
- Yang, S., C. Cohen, P. Peng, Y. Zhao, L. Cassard, Z. Yu, Z. Zheng, S. Jones, N. Restifo, S. Rosenberg and R. Morgan (2008). "Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition." Gene Ther. **15**(21): 1411-1423.
- Zhou, Y., J. Wang, I. Zhou, H. Lou, C. Li, Z. Chen, Z. Zhang, S. Liu, S. Wu, W. Tan, S. Jiang and C. Zhou (2013). "Simultaneous expression of displayed and secreted antibodies for antibody screen." PLoS One. **8**(11): e80005.